

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**Giovana Hartmann Carioletti**

**A serotonina contribui para hipotensão e alterações da reatividade  
venosa no choque endotoxêmico**

**FLORIANÓPOLIS  
2015**



**Giovana Hartmann Carioletti**

**A serotonina contribui para hipotensão e alterações da reatividade venosa no choque endotoxêmico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Áurea Elizabeth Linder

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carioletti, Giovana Hartmann

A serotonina contribui para hipotensão e alterações da reatividade venosa no choque endotoxêmico / Giovana Hartmann Carioletti ; orientadora, Áurea Elizabeth Linder - Florianópolis, SC, 2015.  
96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Veias. 3. Serotonina (5-HT). 4. Sepsis. 5. Reatividade vascular. I. Linder, Áurea Elizabeth. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Perci Carioletti e Valdir Carioletti, pelo constante incentivo, amor, investimento e compreensão dedicados a mim sempre.

Ao meu companheiro de todos os momentos, Erick Costa, pelo amor, carinho, incentivo e apoio. Obrigada por tudo meu bem.

À minha querida orientadora, Prof. Dra. Elizabeth Linder, pela oportunidade, orientação, paciência, amizade, por acreditar em mim e me incentivar desde a iniciação científica e, claro, pelos inúmeros ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelos ensinamentos que contribuíram para a minha formação. Principalmente aos Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e Prof. Dr. Jamil Assreuy por disponibilizarem equipamentos importantes para a realização deste trabalho.

À Kiuanne Lobo, que se tornou uma amiga nos últimos 2 anos, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Adriane Madeira, pelo suporte técnico, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Erick Costa, Kiuanne Lobo, Elaine Anton, Karla Guarido, Muryel Gonçalves, Angélica Bernardelli, Daiana Vogel, Ronald Paiva, Priscila de Souza, pelo convívio agradável, cooperação durante a realização do trabalho e ensinamentos compartilhados.

Aos demais amigos e colegas de mestrado, Tiago Barbosa, Fernanda Junkes, Lucas Mascarin, Camila Zanella, Maíra Norões, Cristina Lorenzini, Elaine Anton e Jairo Thiago obrigada pelas conversas, pelos momentos divertidos de distração e amizade.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela dedicação em atender às necessidades dos alunos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e do biotério pela ajuda prestada.

Aos animais que possibilitaram novos conhecimentos e deram a vida para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.



*“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”*

**Elleanor Roosevelt**



## RESUMO

**Carioletti, G.H. “A serotonina contribui para hipotensão e alterações da reatividade venosa no choque endotoxêmico”.** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Este trabalho teve como objetivo avaliar se a 5-HT liberada durante a agregação plaquetária participa da hipotensão observada na sepse e se isto estaria relacionado a uma hiporreatividade a agentes vasoconstritores nas veias. Para isso, foram utilizados ratos Wistar machos (250 - 300 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, que foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS) ou salina após 5 minutos dos pré-tratamentos com 5-HT, ketanserina ou veículo, administrados via intraperitoneal. Foram realizadas medidas de tensão isométrica das veias jugulares e hemograma dos ratos após 6 e 24 horas dos tratamentos. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram avaliadas por pletismografia de cauda 3, 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após os tratamentos. Nos animais pré-tratados com veículo, após 6 horas do tratamento com LPS, observamos hiporreatividade na veia jugular ao agente contrátil 5-HT e hiper-reatividade aos agentes vasodilatadores acetilcolina, nitroprussito de sódio e noradrenalina em relação ao grupo tratado com salina. Após 24 horas do tratamento com LPS nos animais pré-tratados com veículo, as respostas contráteis e relaxantes na veia jugular não foram diferentes daquelas dos animais que receberam salina, exceto para o nitroprussiato de sódio, que manteve uma resposta vasodilatadora aumentada. O pré-tratamento com 5-HT antes de LPS manteve a hiporreatividade ao agente contrátil em veia jugular após 24 horas e atenuou a hiper-reatividade à acetilcolina e à noradrenalina em 6 horas e ao nitroprussiato de sódio em 24 horas. O pré-tratamento com o antagonista de receptores da 5-HT<sub>2A</sub>, a ketanserina, preveniu a hiporreatividade à 5-HT em veia jugular após 6 horas de tratamento quando comparados aos animais que receberam veículo como pré-tratamento e também preveniu a hiper-reatividade aos agentes relaxantes observada em animais pré-tratados com veículo. O LPS causou queda na pressão arterial até 24 horas após o tratamento, acompanhada de um aumento na frequência cardíaca que ficou elevada durante toda análise (até 72 horas do tratamento). O pré-tratamento com 5-HT dificultou o reestabelecimento da pressão arterial dos animais tratados com LPS, que se manteve diminuída até 48 horas após o tratamento, também acompanhada por aumento da frequência cardíaca. A ketanserina facilitou o

reestabelecimento da pressão arterial e da frequência cardíaca dos animais tratados com LPS, que voltaram aos níveis basais 12 horas após o tratamento. O tratamento com LPS ocasionou um aumento na dosagem indireta de óxido nítrico (NO), que não foi alterada com o pré-tratamento com 5-HT, mas que foi inibido com o pré-tratamento com a ketanserina. Além disso, os animais que receberam LPS apresentaram diminuição de plaquetas, linfócitos, monócitos e aumento de granulócitos, assim como dos animais pré-tratados com 5-HT. Ketanserina foi capaz de atenuar a queda na contagem de plaquetas em 24 horas após o tratamento. Podemos concluir que a 5-HT está envolvida na hipotensão observada no choque endotoxêmico associada à hiporreatividade venosa a agentes vasopressores. Além disso, antagonistas da 5-HT como o utilizado em nosso estudo, podem amenizar esses efeitos e melhorar os parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares do choque endotoxêmico.

**Palavras-chave:** Veias. Serotonina. 5-HT. Seps. Contração vascular. Relaxamento vascular.

## ABSTRACT

**Carioletti, G. H. "Serotonin contributes to hypotension and changes venous reactivity in shock endotoxêmico".** 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

This study aimed to evaluate whether 5-HT released by platelet aggregation during sepsis contributes to hypotension observed in sepsis and if this is related to venous hyporeactivity to vasoconstrictor agents. For this, Wistar rats (250-300 g) from the Central Animal Facility of the Federal University of Santa Catarina treated with lipopolysaccharide (LPS) or saline after 5 minutes of pre-treatment with 5-HT, ketanserin or vehicle were used. Isometric tension measurements of the rat jugular veins and blood cell count were performed 6 and 24 hours after treatment. Blood pressure and heart rate measurements by tail cuff were obtained 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hours after treatment. When compared to saline treatment, 6 hours after treatment with LPS in the jugular veins from animals pretreated with vehicle, we observed decreased contractile response to 5-HT and increased relaxing responses to acetylcholine, norepinephrine and sodium nitroprusside. After 24 hours of LPS treatment in animals pretreated with vehicle, contractile and relaxant responses in the jugular vein were not different from those of animals receiving saline except for sodium nitroprusside, which maintained an increased relaxing response. Pretreatment with 5-HT maintained the hyporeactivity to the contractile agent in the jugular vein up to 24 hours after LPS treatment and decreased the hyperreactivity to acetylcholine and norepinephrine at 6 hours and to sodium nitroprusside at 24 hours after LPS treatment. Pretreatment with the 5-HT receptor antagonist, ketanserin, prevented either the decreased contraction to 5-HT and the increased relaxing responses to acetylcholine, norepinephrine and sodium nitroprusside in the jugular vein after 6 hours of LPS treatment compared with animals receiving vehicle as pretreatment. LPS caused a drop in blood pressure up to 24 hours after treatment, accompanied by an increase in heart rate that was maintained high throughout analysis (72 hours). Pretreatment with 5-HT impaired blood pressure recovery in animals treated with LPS, which remained decreased up to 48 hours after treatment, accompanied by increased heart rate. Ketanserin improved the reestablishment of blood pressure and heart rate of the animals treated with LPS, which returned to baseline levels 12 hours after treatment. Treatment with LPS caused an

increase in plasma nitric oxide (NO) content, which was not modified by pre-treatment with 5-HT but was inhibited by pre-treatment with ketanserin. In addition, animals receiving LPS after vehicle and 5-HT as pretreatments exhibited reduced platelets, lymphocytes, monocytes and increased granulocytes. Ketanserin was able to mitigate the decline in platelet count at 24 hours after treatment. We can conclude that 5-HT from platelet aggregation in sepsis is involved in the hypotension observed in endotoxic shock associated with venous hyporeactivity to vasopressor agents. In addition, antagonists of 5-HT, as the one used in our study, may mitigate these effects and improve the hemodynamic and cardiovascular events observed in endotoxic shock.

**Keywords:** Veins. Serotonin. 5-HT. Sepsis. Vascular contraction. Vascular relaxation.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA –	Ácido 5-hidroxindolacético
5-HT –	5-hidroxitriptamina
AACP –	American College of Chest Physicians
Ach –	Acetilcolina
AMP-c –	Monofosfato cíclico de adenosina
BPM –	Batimentos Por Minuto
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> –	Dextrose
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O –	Cloreto de Cálcio di-hidratado
CASP –	Peritonite Induzida pela Introdução de Cateter no Colo
Ascendente (do inglês Colon Ascendens Stent Peritonitis)	
CCR –	Curva Concentração Resposta
CEUA –	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP –	Ligadura e Perfusão do Ceco
CO <sub>2</sub> –	Dióxido de Carbono
DMSO –	Dimetil Sulfóxido
EDTA ou Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O –	Ácido Etilenodiamina Tetra-acético
EM –	Efeito Máximo
EPM –	Erro Padrão da Média
FC –	Frequência Cardíaca
KCl –	Cloreto de Potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> –	Fosfato de Potássio Monobásico
LPS –	Lipopolissacarídeo
MAO –	Enzima Monoamina Oxidase
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O –	Sulfato de Magnésio heptahidratado
NaCl –	Cloreto de Sódio
NaHCO <sub>3</sub> –	Bicarbonato de Sódio
NF-κβ –	Fator Nuclear kappa (do inglês Nuclear Factor-kappa)
NLR –	Receptor do tipo NOD (do inglês NOD-like Receptor)
NO –	Óxido Nítrico
NOS –	Óxido Nítrico Sintase
NOS <sub>2</sub> -	Óxido Nítrico Sintase Induzida
NPS –	Nitroprussiato de Sódio
O <sub>2</sub> –	Oxigênio
PAMPs –	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês Pathogen-associated Molecular Patterns)
PAS –	Pressão Arterial Sistólica
PRRS –	Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês Pattern Recognition Receptors)
SCCM –	Society of Critical Care Medicine

SERT – Transporter)	Transportador de Serotonina (do inglês Serotonin
SIRS – inglês Systemic	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (do Inflammatory Response Syndrome)
SSF –	Solução Salina Fisiológica
TLRs –	Receptor do tipo Toll (do inglês Toll-like Receptor)
TPH –	Enzima Triptofano Hidroxilase
TxA <sub>2</sub> –	Tromboxano A <sub>2</sub>
UFSC –	Universidade Federal de Santa Catarina
UTI –	Unidade de Terapia Intensiva



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Efeito na PAS e FC de ratos em diferentes tempos de tratamento com LPS.....	45
<b>Figura 2</b> - Curvas concentração resposta para 5-HT em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.....	48
<b>Figura 3</b> - Curvas concentração resposta para acetilcolina em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.....	52
<b>Figura 4</b> - Curvas concentração resposta para nitroprussiato de sódio (NPS) em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.....	55
<b>Figura 5</b> - Curvas concentração resposta para noradrenalina em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.....	59
<b>Figura 6</b> - Dosagem plasmática de NOx após 6 horas e 24 horas do tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo (A e B), 5-HT (C e D) ou ketanserina (E e F) como pré-tratamento.....	61
<b>Figura 7</b> - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo como pré-tratamento.....	63
<b>Figura 8</b> - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo como pré-tratamento.....	64
<b>Figura 9</b> - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam 5-HT como pré-tratamento.....	65
<b>Figura 10</b> - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam 5-HT como pré-tratamento.....	66
<b>Figura 11</b> - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam ketanserina como pré-tratamento.....	67
<b>Figura 12</b> - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam ketanserina como pré-tratamento..	68

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> - Divisão dos grupos experimentais utilizados para a realização dos procedimentos experimentais. ....	38
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, conforme estabelecido na Conferência de Consenso feita pelo American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine, no ano de 1992. ....	25
<b>Tabela 2:</b> Farmacologia dos receptores 5-HT e sua localização no sistema cardiovascular.....	31
<b>Tabela 3:</b> Valores de efeito máximo de contração em miligramas obtidos nas CCR para 5-HT para os grupos que receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.....	49
<b>Tabela 4:</b> Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para acetilcolina para os grupos que receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.....	53
<b>Tabela 5:</b> Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para nitroprussiato de sódio para os grupos receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas. ....	56
<b>Tabela 6:</b> Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para noradrenalina para os grupos receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.....	60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1. SEPSE .....	23
1.2. SEROTONINA .....	28
1.3. VEIAS E O SISTEMA CARDIOVASCULAR .....	33
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. ANIMAIS .....	37
3.2. DROGAS E REAGENTES .....	37
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
3.4. COLETA DE TECIDOS .....	38
3.5. MEDIDAS DE TENSÃO ISOMÉTRICA DE VEIA JUGULAR DE RATO .....	38
3.5.1. <i>Isolamento e montagem da veia jugular para preparações isoladas.....</i>	<i>38</i>
3.5.2. <i>Protocolos experimentais das medidas de tensão isométrica ..</i>	<i>39</i>
3.6. MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS .....	40
3.7. HEMOGRAMA E DOSAGEM PLASMÁTICA DE NOX .....	40
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	41
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
4.1. MEDIDAS NÃO INVASIVAS DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS .....	43
4.2. MEDIDAS DE TENSÃO ISOMÉTRICA DE VEIA JUGULAR DE RATO.....	46
4.2.1. <i>Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina....</i>	<i>46</i>
4.2.2. <i>Avaliação da resposta induzida por acetilcolina em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado depois do pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina .....</i>	<i>50</i>
4.2.3. <i>Avaliação da resposta induzida por nitroprussiato de sódio em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após o pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina.....</i>	<i>53</i>

4.2.4. Avaliação da resposta induzida por noradrenalina em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após o pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina.	57
4.3. DOSAGEM DE NOX PLASMÁTICO DE RATOS 6 E 24 HORAS APÓS O TRATAMENTO COM LPS OU SALINA REALIZADO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO, 5-HT OU KETANSERINA .....	60
4.4. HEMOGRAMA DE ANIMAIS TRATADOS COM LPS E SALINA VEÍCULO, 5-HT OU KETANSERINA SEGUIDO DE LPS OU VEÍCULO POR 6 E 24 HORAS..	62
4.4.1. Contagem celular em amostras de animais tratados com LPS ou salina por 6 e 24 horas.....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1. PRÉ-TRATAMENTO COM VEÍCULO.....	69
5.2. PRÉ-TRATAMENTO COM 5-HT .....	74
5.3. PRÉ-TRATAMENTO COM KETANSERINA .....	77
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Sepses

A palavra sepsis é derivada do grego “sepo” e significa decadência ou putrefação. O uso inicial desta palavra descrevia um estado de “decomposição de matéria orgânica animal ou vegetal na presença de bactérias”. E este significado continua praticamente o mesmo há mais de 2700 anos (GEROULANOS e DOUKA, 2006). A sepsis se caracteriza por uma inflamação sistêmica e lesão tecidual generalizada, decorrente de uma infecção grave, geralmente de origem bacteriana (VINCENT e ABRAHAM, 2006). Relatos sobre a existência da sepsis podem ser encontrados até mesmo em textos de Hipócrates (460 – 377 a.C.), que descreve um processo de perigo, deterioração biológica fétida ou putrefação (COSTA, 2002). No entanto, as primeiras menções às bactérias só foram feitas em meados de 1680 por Leeuwenhock e apenas duzentos anos mais tarde, com Pauster e Koch é que foi estabelecida uma relação entre bactérias e infecção. E em 1914, a liberação de patógenos na circulação sanguínea foi descrita por Schottmüller como sendo a causa dos sinais e sintomas observados em uma infecção (VINCENT e ABRAHAM, 2006).

Nos dias atuais, muito já se evoluiu em relação ao conhecimento sobre a sepsis, sua fisiopatologia, epidemiologia, diagnóstico e esquemas terapêuticos. No entanto, as taxas de prevalência e mortalidade continuam bastante altas, sendo o choque séptico um dos principais causadores de morte em unidades de terapia intensiva (UTI) no mundo (ALBERTI et al., 2002; NDUKA e PARRILLO, 2011).

Nos Estados Unidos a sepsis acomete cerca de 750.000 pessoas por ano e leva à morte aproximadamente 29% dos casos (CASTELLHEIM et al., 2009; MARTIN e WHEELER, 2009). No Brasil, a sepsis severa atinge aproximadamente 27% dos pacientes de UTI, com uma taxa de mortalidade em torno de 40%. Este índice sobe para cerca de 53% quando diagnosticado o choque séptico (SILVA et al., 2004).

Apesar de até os anos 90 já existir uma longa jornada histórica de estudos acerca da sepsis e doenças infecciosas, havia dificuldades em padronizar conceitos. Por isso em 1992, a comunidade médica e científica sentia a necessidade de unificar conceitos para facilitar a comunicação sobre esta doença. Por isso, na Conferência de Consenso convocada pela American College of Chest Physicians (ACCP) e pela Society of Critical Care Medicine (SCCM), foram padronizados vários

conceitos e definições acerca do diagnóstico de infecções e sepse (ACCP/SCCM, 1992), como demonstrados na Tabela 1. Esta padronização foi uma facilitadora na clínica para a detecção da fase de evolução da doença em que o paciente se encontra e para a intervenção terapêutica adequada.



**Tabela 1:** Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, conforme estabelecido na Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, no ano de 1992.

Condição	Definição
<b>Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)</b>	<p>Conjunto de manifestações clínicas em resposta a condições clínicas severas (infecção, hemorragia, trauma, pancreatite, queimadura) Caracterizada pela presença de duas ou mais das seguintes manifestações clínicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura corporal <math>&gt;38^{\circ}\text{C}</math> ou <math>&lt;36^{\circ}\text{C}</math></li> <li>• Frequência cardíaca <math>&gt;90</math> batimentos/min.</li> <li>• Frequência respiratória <math>&gt;20</math> ipm ou <math>\text{pCO}_2 &lt; 32</math> mmHg</li> <li>• Leucócitos <math>&gt;12.000</math> ou <math>&lt;4.000</math> <math>\text{mm}^3</math> ou bastonetes <math>&gt;10\%</math>.</li> </ul>
<b>Sepse</b>	Presença de dois ou mais sinais e sintomas descritos na SIRS associados a um processo infeccioso
<b>Sepse Grave</b>	Quadro de sepse associada à disfunção orgânica, evidências de hipoperfusão ou hipotensão, que responde à expansão volêmica isoladamente. A hipoperfusão pode incluir acidose láctica, oligúria ou alteração do estado mental. A hipotensão induzida pela sepse é definida pela pressão sistólica menor que 90 mmHg ou reduzida em 40 mmHg ou mais em relação ao valor basal. Sem a necessidade de agentes vasopressores
<b>Choque séptico</b>	Sepse grave com hipotensão arterial, apesar de terapia com fluido acompanhada de hipoperfusão tecidual e suas complicações
<b>Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS, do inglês “multiple Organ dysfunction syndrome”)</b>	Presença da alteração na função orgânica onde a homeostasia não é mantida sem intervenção terapêutica. O processo é contínuo e dinâmico, podendo variar de disfunção leve até falência total do órgão. São utilizados parâmetros de seis órgãos-chave: pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e coagulação.

Como descrito anteriormente, a sepse é um estado de inflamação sistêmica, desencadeada devido a uma infecção. Na

existência de uma lesão tecidual ou infecção, ocorre simultaneamente, a ativação do sistema imune e liberação de agentes pró e anti-inflamatórios, sendo que o processo de cura e reparação tecidual depende do equilíbrio entre esses fatores. Durante uma invasão bacteriana, a ativação do sistema imunológico acontece em caráter benéfico. No entanto, na sepse, essa ativação se dá de forma exacerbada ou mal regulada (BONE et al., 1992; STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

Mais da metade dos casos de sepse são causados por bactérias gram-negativas, e esse índice é ainda maior quando o quadro evolui para choque séptico (RANGEL-FRAUSTO, 2005). Outros agentes infecciosos também podem levar a um quadro de sepse, como bactérias gram-positivas, fungos, parasitas e vírus, mas em menores proporções. Em geral, a infecção tem início em um sítio primário e se espalha para outras regiões. Os sítios primários de maior incidência são as infecções do trato respiratório, seguido de infecções intra-abdominais e por fim infecções do trato urinário (ANGUS et al., 2001).

O início da resposta do hospedeiro durante a sepse ou lesão tecidual ocorre através da ativação de receptores presentes na parede celular das células do sistema imune (CINEL e OPAL, 2009). Esses receptores são denominados de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, *do inglês pattern recognition receptors*). Dentre os PRRs, os receptores do tipo Toll (TLRs, *do inglês toll-like receptors*) são os mais importantes e estão presentes na superfície e interior das células. Outros receptores como os do tipo NOD (NLR, *do inglês NOD-like receptor*) e proteínas como CD14 possuem papel importante no reconhecimento de patógenos (UEMATSU e AKIRA, 2006).

Estes receptores iniciam a resposta imune inata e regulam a resposta imune adaptativa à infecção ou lesão tecidual, quando estimulados por constituintes celulares dos micro-organismos invasores, como lipoproteínas de parede celular bacteriana, lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas, fragmentos de membranas fúngicos, ácidos nucleicos bacterianos e virais. Estes elementos fúngicos, bacterianos e virais são denominados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs *do inglês pathogen-associated molecular patterns*), (GRANUCCI, FOTI e RICCIARDI-CASTAGNOLI, 2005).

Os PAMPs se ligam aos PRRs, tais como TLR, e ativam as cascatas de transdução de sinal intracelular que levam ao acionamento de ativadores de transcrição como o fator nuclear kappa (NF- $\kappa$ B, *do inglês nuclear factor-kappa*). Uma vez ativo, o NF- $\kappa$ B move-se do

citoplasma para o núcleo e ativa uma série de genes para a transcrição de proteínas de fase aguda, óxido nítrico (NO), fatores de coagulação, moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1, bem como ativação de enzimas de proteases celulares (CINEL e OPAL, 2009).

As citocinas inflamatórias liberadas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Embora os neutrófilos ativados atuem contra os micro-organismos, eles também danificam o endotélio através da libertação de mediadores que aumentam a permeabilidade vascular, levando a edema pulmonar e de outros tecidos. Além disso, as células endoteliais ativadas liberam NO, um potente vasodilatador que tem papel fundamental na patogênese do choque séptico (RUSSELL, 2006).

As células endoteliais quando ativadas, juntamente com monócitos, liberam fator tecidual, que ativa a cascata de coagulação, levando a mais uma das características da sepse, que é a coagulação intravascular disseminada (MARSHALL, 2001).

Dentre as características da sepse grave e choque séptico está o acometimento cardiovascular, que se dá pela hipotensão arterial (BONE et al., 1992) e depressão da função miocárdica (PARKER et al., 1984). A evolução cardiovascular da sepse pode ser dividida em duas fases, a primeira é a fase hiperdinâmica, onde há aumento do débito cardíaco, com elevação da frequência cardíaca, na tentativa de elevar a pressão arterial, além de uma diminuição da resistência vascular periférica, devido à dilatação sistêmica dos vasos de resistência. A segunda, fase hipodinâmica, é caracterizada pela diminuição do débito cardíaco e hipotensão refrataria ao uso de vasopressores (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; FLYNN, CHOKKALINGAM MANI e MATHER, 2010).

Existem diversos modelos animais para se estudar a patologia da sepse (BURAS, HOLZMANN e SITKOVSKY, 2005), no entanto a administração exógena de toxina bacteriana (LPS) é amplamente utilizada no estudo da sepse, por mimetizar vários efeitos observados na clínica na sepse e choque séptico. Exemplos desses efeitos são as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tissular, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação. Além disso, é um modelo prático e de fácil reprodutibilidade em diferentes espécies animais, como ratos (MACARTHUR et al., 2000), camundongos (ROVAI, HERSCHMAN e SMITH, 1998), coelhos (BEN-SHAUL et

al., 1999), cães (MITAKA et al., 1997) e primatas (HINSHAW et al., 1992). A administração de LPS na cavidade peritoneal se aproxima de um quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir da disseminação de LPS de um foco inicial (cavidade peritoneal) (REMICK et al., 2000). Mas, ainda assim, o início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como acontece na maioria dos casos clínicos.

## 1.2. Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é uma amina biogênica, semelhante à adrenalina, noradrenalina, dopamina e histamina, e é produzida através da hidroxilação e descarboxilação do aminoácido L-triptofano (JACOBS e AZMITIA, 1992). A 5-HT é um neurotransmissor que atua tanto no sistema nervoso central, como também em órgãos periféricos, como no intestino. Está envolvida em diversos processos fisiológicos tais como, o humor, o sono, a temperatura corporal, esvaziamento da bexiga, além de motilidade intestinal (RAPPORT, GREEN e PAGE, 1948).

A 5-HT foi descoberta por dois grupos distintos há mais de 60 anos. Em 1937, o cientista italiano Vittorio Erspamer extraiu uma substância das células enterocromafins do trato gastrointestinal de diversas espécies animais que induzia contração de musculatura lisa, denominada por ele de enteramina. Alguns anos mais tarde, em meados de 1948, um grupo de pesquisadores norte americanos composto por Irvine Page, Maurice Rapport e Arda Green isolou uma substância do soro bovino também com propriedade de aumentar o tônus muscular à qual denominou serotonina. Posteriormente, as substâncias enteramina e serotonina, foram identificadas como sendo a 5-hidroxitriptamina, chegando à conclusão de que eram a mesma substância (ERSPAMER e ASERO, 1952; RAPPORT, GREEN e PAGE, 1948).

O aminoácido essencial triptofano é o precursor para a 5-HT. A maior parte da síntese de 5-HT ocorre nas células enterocromafins do intestino, sendo que há também uma pequena parcela de síntese nos núcleos da rafe do cérebro, em células de revestimento neuroendotelial do pulmão e em alguns outros locais (COOPER, BLOOM e ROTH, 2003). A síntese de serotonina é dependente da ação da enzima triptofano-hidroxilase (TPH), que transfere um grupo hidroxila no anel benzilo de triptofano. A descarboxilação subsequente por aminoácidos decarboxilases resulta na formação de 5-HT. Estudos da literatura

mostram que existem duas isoformas de TPH, uma isoforma periférica (TPH-1) e uma isoforma central (TPH-2) (WALTHER et al., 2003), o que permite a existência de fontes distintas de 5-HT, a periférica e a central.

A degradação da 5-HT é realizado através da enzima monoamina oxidase (MAO), formando o seu metabólito, o ácido 5-hidroxitriptacético (5-HIAA). Essa enzima é encontrada na mitocôndria e se caracteriza por ser uma enzima intracelular existente em duas formas, a MAO-A e a MAO-B. A MAO está envolvida na degradação de outras monoaminas como a noradrenalina e a dopamina. A degradação da 5-HT é preferencialmente feita pela MAO-A (NI e WATTS, 2006).

Por ser considerada uma molécula protonada em pH fisiológico, a 5-HT é incapaz de ultrapassar membranas celulares e a barreira hematoencefálica. O transporte da 5-HT é realizado a partir do transportador de 5-HT (SERT, do inglês *Serotonin Transporter*), que atua no transporte da 5-HT nas duas direções, tanto para dentro quanto para fora das células (ERICKSON, EIDEN e HOFFMAN, 1992). No sistema nervoso periférico, plaquetas possuem um SERT de alta eficácia, o que lhes permite transportar e armazenar a 5-HT a partir do intestino e do pulmão e liberá-la em um evento trombótico (VANHOUTTE, 1991). A captação de 5-HT ocorre também através do SERT presente em linfoblastos, monócitos, células endoteliais, artérias mesentéricas, aorta, carótida e na veia cava (LINDER, DIAZ, et al., 2008; NI et al., 2004, 2008). Porém, as plaquetas são responsáveis pelo maior estoque de 5-HT corporal e apesar de não serem capazes de sintetizar a 5-HT, podem captar a partir do plasma a 5-HT produzida (SNEDDON, 1969).

A 5-HT possui sete famílias de receptores (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>) com pelo menos 15 subtipos diferentes. Estes foram divididos de acordo com a característica de cada um, levando em conta critérios como ligantes, vias de transdução de sinal e estrutura (em relação à sua sequência de aminoácidos e nucleotídeos). Por apresentar uma grande quantidade de receptores, a 5-HT atua na maioria dos sistemas fisiológicos através da ativação de seus receptores. A maioria dos receptores da 5-HT são acoplados à proteína G, com exceção do 5-HT<sub>3</sub> que é um receptor ligado a um canal iônico (HOYER et al., 1994).

No sistema circulatório, a 5-HT regula o tônus através da ativação de alguns subtipos de receptores localizados nas células da musculatura lisa e nas células endoteliais. Estudos da literatura demonstraram que o subtipo de receptor envolvido na contração da veia

jugular é o 5-HT<sub>2A</sub> (LINDER et al., 2010). Além disso, a 5-HT pode exercer seus efeitos através da ativação de receptores presentes em células endoteliais e consequente liberação de substâncias relaxantes ou contráteis. Ullmer e colaboradores (1995) identificaram os subtipos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub> em células endoteliais de diferentes espécies. Na **tabela 2** é possível observar os principais subtipos de receptores da 5-HT que atuam no sistema cardiovascular.

**Tabela 2:** Farmacologia dos receptores 5-HT e sua localização no sistema cardiovascular.

<b>Receptor</b>	<b>Antagonista</b>	<b>Localização e resposta relevante no sistema cardiovascular</b>
<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	WAY100635, NAN190	SNC (aumento da PA)
<b>5-HT<sub>1B</sub></b>	GR-127935 (alguma afinidade <sub>1D</sub> ), GR55562, isamoltane, SB236057	Músculo liso (contração); Terminações pré-sinápticas simpáticas (inibição da NE release); gânglios simpáticos (inibir a transmissão); sistema nervoso central (aumento da PA)
<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	SB 272183, LY310762, BRL15572	Músculo liso (contração)
<b>5-HT<sub>1F</sub></b>	Não avaliado	Músculo liso (contração), nervo trigêmeo
<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	R-96544, MDL100907, volinanserina	Plaquetas (agregação e liberação de 5- HT); músculo liso (contração), glândula adrenal (liberação de adrenalina), coração (taquicardia, contração)
<b>5-HT<sub>2B</sub></b>	LY272015, RS127445	Endotélio (relaxamento), músculo liso (contração), válvulas cardíacas (proliferação)
<b>5-HT<sub>3</sub></b>	Odansetrona, granisetrona	Nervo vago (bradicardia), gânglios
<b>5-HT<sub>4</sub></b>	GR113808, RS100235, SB204070	Cardiomiócitos (contração)
<b>5-HT<sub>7(A-D)</sub></b>	SB-269970, SB- 258719	Músculo liso (relaxamento), cardiomiócitos (contração)

**Fonte:** Adaptado de (WATTS et al., 2012).

O sistema circulatório é exposto à 5-HT através da agregação plaquetária, liberação de 5-HT a partir dos nervos serotoninérgicos, e

através da exposição direta à 5-HT livre no sangue (DIAZ et al., 2008). Por causa da estreita associação das plaquetas com os vasos sanguíneos, há muitos anos se estuda o papel da 5-HT no controle do tônus vascular e modificação da pressão arterial. Algumas descobertas sugerem que a 5-HT contribua para hipertensão sistêmica, dentre elas os níveis plasmáticos (livres) de 5-HT estão elevados em modelos experimentais e humanos de hipertensão (BRENNER et al., 2007; FETKOVSKA et al., 1990). Inibidores da SERT, como a fluoxetina, causam um aumento na pressão arterial (AMSTERDAM et al., 1999; LAZARTIGUES et al., 2000). A capacidade das artérias em armazenar 5-HT através da SERT está prejudicada na hipertensão (NI e WATTS, 2006). E ainda, observa-se uma hiper-reatividade à 5-HT em artérias de seres humanos hipertensos e em modelos experimentais de hipertensão (RUSSELL et al., 2002; WATTS e FINK, 1999).

Por outro lado, há estudos que trazem o oposto quanto à participação de 5-HT no controle da pressão arterial, como o que foi observado por Diaz e colaboradores (2008) com a administração crônica de 5-HT que demonstrou que a 5-HT reduz a pressão arterial tanto em animais hipertensos como em normotensos. Alguns anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisadores (DAVIS et al., 2012) demonstraram que a infusão crônica de 5-HT reduz a resistência periférica total. Por isso, embora a 5-HT seja conhecida principalmente como um vasoconstritor *in vitro*, estudos recentes demonstraram que a administração crônica *in vivo* de 5-HT resulta em uma diminuição da pressão arterial de ratos (DAVIS et al., 2013).

Levando em consideração a relação entre plaquetas e 5-HT, dados da literatura apontam mudanças na função de agregação plaquetária e coagulação em síndromes inflamatórias sistêmicas e infecções, como na sepse. É comum observar eventos pró ou antitrombóticos nestas doenças inflamatórias. Além disso, é comum observar uma contagem plaquetária inferior ao valor de referência, que pode ser devido a hemorragias ou coagulação intravascular disseminada durante a sepse. (VINCENT, YAGUSHI e PRADIER, 2002).

Alguns estudos realizados a partir de autópsia de seres humanos que sofreram de sepse apontam que durante a doença, há formação de microtrombos em pequenas, médias e grandes veias e artérias, indicando uma coagulação intravascular disseminada (LEVI, 2008). Isso indica que na sepse a ativação plaquetária está exacerbada. E uma vez ativadas, as plaquetas tendem a liberar mediadores inflamatórios tais como tromboxano A2 (TxA2) e também a 5-HT. Dados da literatura mostram que concentrações plasmáticas de TxA2 estão elevadas em vários



modelos de choque séptico (COKER et al., 1983). E, ainda, que concentrações de 5-HT estão aumentadas em fígado de ratos que receberam altas doses de LPS (ENDO, 1984).

### 1.3. Veias e o sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular é um circuito que fornece suprimento sanguíneo, oxigênio e nutrientes a todos os órgãos que compõem os diversos organismos. É composto por dois órgãos, que são peças chave para a homeostase corpórea, o coração e vasos. Além de manter a homeostase corporal, o sistema cardiovascular está envolvido no controle da pressão arterial. Os fatores que determinam a pressão arterial são a resistência periférica total, determinada pelo tônus arterial e o débito cardíaco, que é o volume de sangue bombeado para fora do coração por minuto (GUYTON, 1991).

Os vasos que compõem o sistema cardiovascular são veias e artérias. Quando comparados, as artérias possuem maior quantidade de músculo liso do que as veias do mesmo tamanho. No entanto, não podemos negligenciar a relevância da contribuição das veias para a homeostase cardiovascular (LINDER et al., 2007). Além disso, em relação às artérias, as veias possuem níveis basais de 5-HT mais elevados e são também capazes de captar 5-HT (LINDER, NI, et al., 2008). Deste modo, parecem funcionar como um reservatório periférico de 5-HT juntamente com as plaquetas. Ainda cabe lembrar que as veias comportam cerca de 70% do total do sangue circulante em qualquer momento (WIEDEMAN, 1963).

As veias são responsáveis por levar o sangue dos tecidos de volta para o coração, têm paredes muito mais finas e diâmetros do lúmen maior do que as artérias e, portanto, podem ampliar muito seu diâmetro. Por consequência, a complacência ( $\Delta$ Volume armazenado /  $\Delta$  pressão de distensão) e capacitância (volume a uma dada pressão interna) das veias (a pressões internas baixas) são maiores em relação às artérias (ROTHER, 1986; SCHMITT e BLACKMAN, 2002). É estimado que a complacência venosa é 30 vezes maior do que complacência arterial em seres humanos (GELMAN, 2008). A parede das veias possui menos músculo liso do que artérias (ROTHER, 1986; SCHMITT e BLACKMAN, 2002). No entanto, modestas alterações no tônus muscular das veias (venoconstrição ou venorelaxamento) pode afetar dramaticamente a quantidade de sangue armazenado dentro delas (FINK, 2009). Por isso o tônus muscular das veias influencia

diretamente a capacitância vascular, que por sua vez influencia a pressão de enchimento circulatório e por consequência o retorno venoso, o volume sistólico, débito cardíaco e por fim a pressão arterial (KUROI, FINK e OSBORN, 2014).

No entanto, existem poucos estudos acerca do papel das veias, sobretudo em doenças que envolvem comprometimento cardiovascular, onde há alterações na pressão arterial, como é o caso da sepse. Vayssettes-Courchay e colaboradores (2003) demonstraram hiporreatividade a agentes vasoconstritores em veia safena de coelhos tratados com LPS. Compreender a função fisiológica desses vasos é de extremo valor para a compreensão da fisiopatologia e tratamento de doenças como a sepse.

Nossa hipótese é de que durante a agregação plaquetária na sepse ocorra liberação de 5-HT, e de que esta 5-HT liberada contribui para a hipotensão observada nesta doença associada à hiporreatividade venosa frente a agentes vasoconstritores e hiper-reatividade frente a vasodilatadores.

## **2. OBJETIVO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar se a 5-HT participa da hipotensão observada na sepse e se isto estaria relacionado a uma hiporreatividade a agentes vasoconstritores nas veias.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- ✓ Padronizar e avaliar a reatividade de veias jugulares de ratos desafiados com LPS;
- ✓ Observar os efeitos do tratamento com 5-HT e ketanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) sobre a reatividade venosa em ratos em choque endotoxêmico;
- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento com 5-HT e ketanserina sobre a pressão arterial de ratos desafiados com LPS.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com peso entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, em gaiolas contendo serragem, com luminosidade e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/escuro;  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , respectivamente) e tiveram acesso livre à água e ração até a realização dos experimentos. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - protocolo nº PP00706.

#### 3.2. Drogas e reagentes

Os seguintes reagentes e drogas foram utilizados neste estudo: cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Syntec, São Paulo, SP, Brasil); cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ); fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), dextrose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA;  $\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_{20}$ ), dimetil sulfóxido (DMSO), acetilcolina (ACh), serotonina (5-HT), ketanserina, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sorotipo tipo 1 O111:B4 (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA).

Os sais utilizados para o preparo da solução fisiológica e as drogas foram dissolvidos em água destilada, sendo exceções a ketanserina que foi dissolvida em DMSO (10%) e o LPS que foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (NaCl 137, KCl 2,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5,  $\text{NaHPO}_4$  8,1 em mM, com pH de 7,4).

#### 3.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos experimentais (quadro 1), sendo tratados com LPS (10 mg/Kg) ou solução salina tamponada (salina; 1 ml/Kg) após 5 minutos dos pré-tratamentos com 5-HT (2 mg/Kg), ketanserina (5 mg/Kg) ou veículo (salina; 1 ml/Kg). Todos os tratamentos e pré-tratamentos foram administrados por via intraperitoneal. Os animais de todos os grupos experimentais foram

avaliados em diferentes tempos após os tratamentos de acordo com o protocolo experimental.

**Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais utilizados para a realização dos procedimentos experimentais.**

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Veículo</b>	Veículo + LPS
	Veículo + Salina
<b>5-HT</b>	5-HT + LPS
	5-HT + Salina
<b>Ketanserina</b>	Ketanserina + LPS
	Ketanserina + Salina

### 3.4. Coleta de tecidos

Para realização dos protocolos experimentais *in vitro* os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/kg; i.p.) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg; i.p.), após completa anestesia foram submetidos à abertura da cavidade torácica seguida de morte por pneumotórax. As veias jugulares externas direita e esquerda foram cuidadosamente removidas e transferidas para uma placa de petri contendo solução salina fisiológica (SSF) conforme quadro 2.

### 3.5. Medidas de tensão isométrica de veia jugular de rato

#### 3.5.1. Isolamento e montagem da veia jugular para preparações isoladas

Com auxílio de uma lupa e de materiais cirúrgicos, o excesso de tecido perivascular e de sangue das veias jugulares foi retirado e descartado. Os vasos foram então seccionados em anéis de aproximadamente 4 a 5 mm e dois ganchos metálicos foram inseridos à luz dos mesmos, sendo, em seguida, transferidos para cubas de vidro (2 ml) contendo SSF, mantidos a 37°C, com pH 7,4 e aerados

continuamente com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Todas as preparações foram submetidas a um período de equilíbrio de 60 minutos, com substituição de líquido nutritivo a cada 15 minutos, e a tensão aplicada aos vasos foi de 0,5g nos primeiros 15 minutos e ajustada para 1g no período subsequente. Foram realizados reajustes da tensão basal dos vasos para a tensão de 1g quando necessário durante o período de estabilização. As alterações de tensão foram medidas utilizando-se transdutores isométricos (Modelo FT-03; Grass Instrument Co., West Warwick, RI, USA) e o registro foi realizado em polígrafo computadorizado da ADI Instruments (Modelo ML 118- Powerlab, AD Instrument, AU, software versão 7.1).

### **3.5.2. Protocolos experimentais das medidas de tensão isométrica**

Após o período de estabilização, a solução nutritiva das cubas foi substituída por uma solução de cloreto de potássio (KCl) 120 mM, para teste de atividade biológica das preparações. Ao alcançar o platô, ou seja, uma estabilização da resposta vasoconstritora induzida pelo KCl, as preparações foram lavadas três vezes consecutivas até retornar à linha basal e passaram por um novo período de estabilização de 30 minutos. Em seguida, as veias jugulares foram estimuladas com 5-HT (10<sup>-6</sup> M) e após 10 minutos de contração, as preparações receberam acetilcolina (10<sup>-5</sup> M) para testar a integridade do endotélio vascular da preparação. Para este estudo foram considerados com endotélio íntegro apenas os anéis de veia jugular que apresentaram relaxamento de 50 % ou mais. Novamente as preparações foram lavadas três vezes consecutivas até o retorno à linha basal e passaram por um novo período de estabilização de 30 minutos. Em seguida, foram realizadas curvas concentração resposta (CCR) cumulativas para 5-HT (10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M), com intervalo de 3 minutos entre a administração de cada concentração. Em outras preparações, CCR cumulativas (também com intervalo de 3 minutos entre as administrações) para acetilcolina (10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M), para noradrenalina (10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M) ou para nitroprussiato de sódio (10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M) foram realizadas sobre o platô da contração induzida por 5-HT (10<sup>-6</sup> M) após 10 minutos de sua administração. Apenas uma CCR foi realizada em cada preparação.

### **3.6. Medidas da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de ratos**

Todos os animais estudados foram submetidos a três medidas de pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC), um dia antes de receberem o tratamento e em diferentes tempos após receberem o tratamento (3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas) sendo que os valores obtidos de PAS e FC utilizados nas análises estatísticas correspondem à média dessas três medidas em cada uma dessas situações.

A medida da PAS foi obtida por pletismografia de cauda. A temperatura da sala onde foram realizadas as medidas foi mantida a 30°C e os animais foram levemente aquecidos por uma manta térmica a fim de promover a dilatação da artéria caudal e possibilitar a detecção do pulso por sensor. Os ratos foram acondicionados individualmente em um contensor de acrílico, para limitar seus movimentos. Após um período de adaptação ao contensor e estabilização (5 a 10 minutos) um manguito (tail-cuff) foi conectado à cauda dos animais e acoplado a uma bomba insufladora de ar (Eletro-Esfigmomanômetro, ADInstruments) para promover o enchimento do manguito e consequente oclusão do fluxo sanguíneo, além de um sensor piezoelétrico para detecção do pulso. Tanto o manguito quanto o sensor foram acoplados a um sistema de aquisição de dados (Programa LabChart, versão 7.0) para registro do pulso correspondente ao fluxo sanguíneo, bem como da pressão necessária para se ocluir a artéria caudal (em mmHg) e da frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM). Depois de estabilizado o fluxo sanguíneo e a FC, três medidas da FC foram realizadas. Em seguida, a bomba insufladora foi acionada (pressão máxima de 200 mmHg) para que o manguito inflasse e ocorresse a oclusão do fluxo sanguíneo que foi observada pela ausência de fluxo detectada pelo sensor, posterior a isso o manguito foi desinflado, havendo retorno do fluxo sanguíneo. O primeiro sinal de pulso detectado pelo sistema de aquisição de dados representou o momento em que a pressão do sistema tornou-se menor do que a pressão sanguínea do rato. Este valor de pressão de oclusão do manguito permitiu o aparecimento do primeiro sinal de pulso considerado equivalente à PAS.

### **3.7. Hemograma e dosagem plasmática de NOx**

Para a realização dos hemogramas foram coletadas amostras de sangue via punção cardíaca (ventrículo direito). Foram coletados cerca de 2 mL de sangue de cada animal, utilizando-se seringas plásticas



contendo EDTA. O hemograma foi, então, realizado em contador hematológico Horiba Abx Micros 60, Shandong, China. O contador hematológico foi previamente calibrado para a diferenciação celular das amostras utilizadas neste estudo.

Para as dosagens plasmáticas de NO<sub>x</sub>, foram utilizadas as amostras utilizadas para a contagem de células do hemograma, que foram centrifugadas à 2.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para dosagem de NO<sub>x</sub>. Utilizando-se do método de Griess, as medidas de óxido nítrico plasmático foram feitas de forma indireta. Os procedimentos podem ser encontrados com detalhes em (BRYAN e GRISHAM, 2007). Em resumo, as amostras plasmáticas (200 µl) foram diluídas e desproteinizadas com sulfato de zinco (1:10), incubadas por 1 hora a 0 °C e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C. Em paralelo a isso, curvas padrão de nitrito e nitrato foram preparadas (0 a 150 µM). As curvas padrão e 200 µL das amostras (em duplicata) foram acondicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 3 horas na presença de *Escherichia coli* expressando a nitrato redutase juntamente com os reagentes de conversão para a conversão do nitrato em nitrito. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 3.000 rpm e 100 µl dos sobrenadantes foram transferidos para outra placa de 96 poços, seguido da adição de 100 µl do reagente de Griess. Após 10 minutos, foi realizada a leitura a 543 nm em Multileitora Infinite M200.

### 3.8. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos através da média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos experimentos para todos os ensaios. O número de animais para cada grupo experimental foi de 3 a 8, conforme indicado nos resultados. Os dados obtidos nos experimentos de medidas de tensão isométrica em órgão isolado foram apresentados como miligramas de tensão ou em porcentagem de relaxamento. Foram também expressos os valores de efeito máximo (EM) de relaxamento ou contração, para avaliar a eficácia da droga utilizada naquela preparação. Os resultados obtidos nas medidas de PAS foram expressos em mmHg, a FC em batimento por minutos e medidas de NO<sub>x</sub> foram expressas em µM. Os gráficos e as análises estatísticas foram obtidos com o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para análise dos testes paramétricos, pareados ou não

pareados, utilizou-se teste  $t$  de Student ou análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguidos pelo teste post hoc de Bonferroni, conforme especificado. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

Os resultados serão divididos em quatro partes (1 a 4) para apresentar o que obtivemos nos protocolos de medida pressão arterial sistólica e frequência cardíaca, medida de tensão isométrica de veia jugular, dosagem de NOx e hemograma.

### 4.1. Medidas não invasivas da pressão arterial e frequência cardíaca de ratos

Nesta seção serão apresentados os resultados das medidas de pressão arterial sistólica (PAS) obtidas por pletismografia de cauda de ratos de todos os grupos experimentais (pré-tratamentos realizados: veículo, 5-HT ou ketanserina) em diferentes tempos após os tratamentos com LPS ou salina. A PAS dos animais foi avaliada 24 antes de cada pré-tratamento, bem como 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos com LPS ou salina. A PAS dos animais 24 horas antes dos pré-tratamentos (basal) não foi diferente entre os grupos que receberam salina ou LPS nos diferentes pré-tratamentos.

Os animais tratados com LPS (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) 5 minutos após o pré-tratamento com veículo (1 ml/kg) possuem os gráficos de PAS e FC representados na figura **1A** e **1B**. Foram realizadas medidas da PAS dos ratos que receberam pré-tratamento com veículo após 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas do tratamento com LPS. Esses resultados foram comparados aos do grupo que recebeu salina no lugar de LPS. Como é possível observar na **figura 1A**, houve uma diminuição significativa na PAS de ratos nos tempos de 3, 6, 9, 12 e 24 horas após o tratamento com LPS quando comparados com os animais que receberam salina. Os valores de PAS no grupo tratado com LPS retornaram a valores semelhantes aos do grupo que recebeu salina após 48 h dos tratamentos. Esses valores foram mantidos até 72 horas após os tratamentos. A PAS de ratos dos dois grupos não foi diferente, 24 horas antes dos tratamentos com LPS ou salina (basal).

A FC dos animais foi medida em paralelo às medidas da PAS. Os animais foram tratados com LPS (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) 5 minutos após o pré-tratamento com veículo (1 ml/kg). Foram realizadas medidas da FC dos ratos que receberam pré-tratamento com veículo após 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas do tratamento com LPS. Esses resultados foram comparados aos do grupo que recebeu salina no lugar de LPS. Como é possível observar na **figura 1B**, o tratamento com

salina não alterou a FC dos animais pré-tratados com veículo em relação aos valores de FC obtidos antes do tratamento. Por sua vez, o tratamento com LPS causou um aumento significativo na FC dos animais nos tempos 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas após o tratamento quando comparado ao grupo que recebeu salina como tratamento.

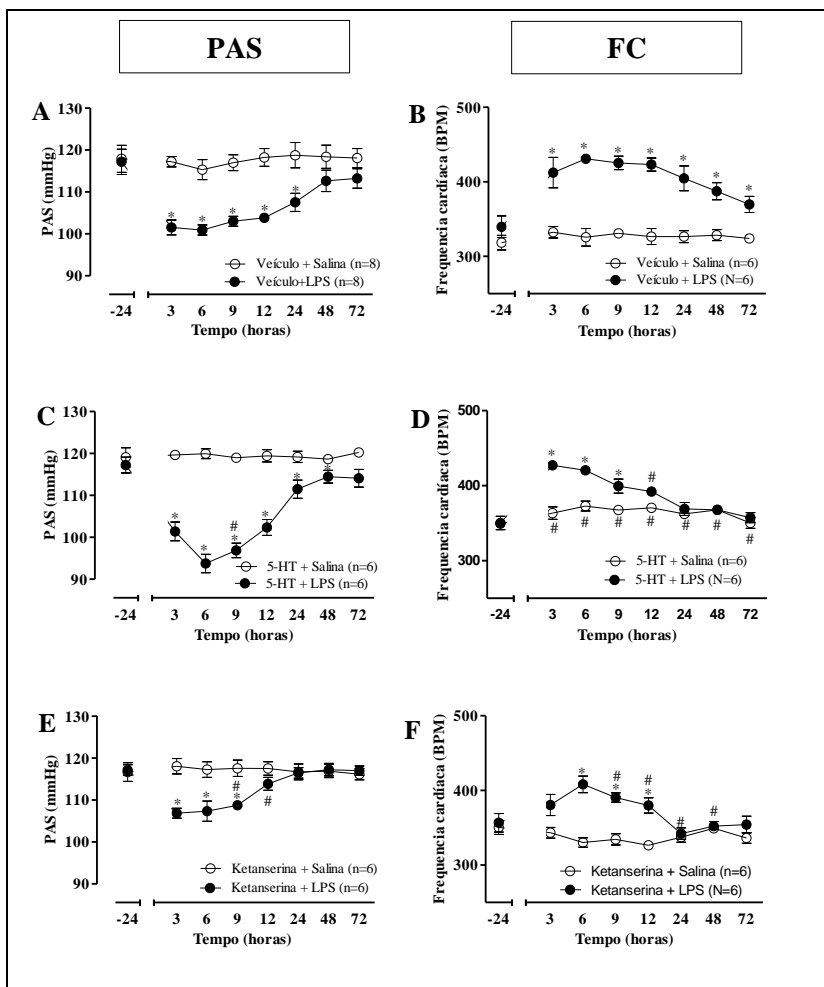
Os animais que receberam pré tratamento com 5-HT (2mg/Kg) e 5 minutos depois receberam LPS (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) passaram por medidas de PAS e FC, que estão representadas na figura **1C** e **1D**. Podemos observar na **figura 1C** que o tratamento com LPS por 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas causou uma diminuição significativa na PAS dos ratos quando comparado com os animais que receberam salina. O pré-tratamento com 5-HT potencializou a queda na PAS induzida após 9 horas do tratamento com LPS quando comparado ao mesmo tratamento e mesmo tempo naqueles animais que receberam veículo como pré-tratamento.

Podemos observar na **figura 1C** que o tratamento com LPS por 3, 6 e 9 horas causou um aumento significativo na frequência cardíaca dos ratos quando comparado com os animais que receberam salina. Após 12, 24, 48 e 72 horas os valores da FC não foram diferentes entre os grupos.

Os animais que receberam pré tratamento com ketanserina (5mg/Kg) e 5 minutos depois receberam LPS (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) passaram por medidas de PAS e FC, que estão representadas na figura **1E** e **1F**.

Na **figura 1E** os animais que receberam o tratamento com ketanserina seguido de LPS apresentaram diminuição significativa na PAS nos tempos de 3, 6, 9 e 12 horas após o tratamento quando comparados com os animais que receberam ketanserina seguido de salina. Quando comparados com os animais que receberam veículo seguido de LPS, houve diferença significativa nos tempos 9 e 12 horas após o tratamento, demonstrando que na presença de ketanserina há um retorno mais rápido aos valores basais de PAS do que na presença de veículo.

Na **figura 1F** os animais que receberam o tratamento com ketanserina seguido de LPS apresentaram aumento significativo na FC nos tempos de 6, 9 e 12 horas após o tratamento quando comparados com os animais que receberam ketanserina seguido de salina.



**Figura 1 – Efeito na PAS e FC de ratos em diferentes tempos de tratamento com LPS.** Os animais receberam pré-tratamento com veículo (1 ml/kg) (A e B), 5-HT (2mg/Kg) (C e D) ou ketanserin (E e F) 5 min antes do tratamento com LPS ou salina. Medidas da PAS foram realizadas 24 horas (-24) antes e 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas após os tratamentos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM dos resultados obtidos de n animais diferentes para cada tratamento. (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t). (#) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Veículo + LPS (teste t).

## 4.2. Medidas de tensão isométrica de veia jugular de rato

Nesta parte serão apresentados os resultados das medidas de tensão isométrica de veia jugular de ratos dos diferentes grupos experimentais. Será dividida em 4 seções, de acordo com o agonista ou agente utilizado para induzir contração (5-HT) e relaxamento (acetilcolina, nitroprussiato de sódio e noradrenalina). Sendo que cada uma apresentará os resultados obtidos nos três pré-tratamentos realizados (veículo, 5-HT ou ketanserina) antes dos tratamentos com LPS ou salina. As medidas foram realizadas após 6 e 24 horas dos tratamentos.

### 4.2.1. Avaliação da resposta contrátil induzida por 5-HT em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina

A **figura 2A** mostra os resultados obtidos nos grupos que receberam tratamento com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1 mL/Kg) após o pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg) e tiveram sua reatividade vascular avaliada após 6 horas do tratamento. Como podemos observar, a administração de concentrações crescentes de 5-HT induziu resposta contrátil dependente da concentração nos 2 grupos experimentais. No entanto, a eficácia (observada pelo efeito máximo) da 5-HT em induzir contração na veia jugular de ratos foi significativamente menor no grupo que recebeu tratamento com LPS quando comparado àquele que recebeu salina (**tabela 3**).

A **figura 2B** mostra as CCR induzidas por 5-HT após 24 horas do tratamento com LPS ou salina precedidos pelo pré-tratamento com veículo. Podemos observar que a 5-HT foi capaz de induzir resposta contrátil dependente da concentração nos 2 grupos experimentais. O tratamento com LPS por 24 h não alterou a eficácia da 5-HT quando comparado ao grupo que recebeu salina por mesmo tempo, como mostrado na **figura 2B e tabela 3**. Houve diferença significativa entre as CCR induzidas por 5-HT do grupo tratado com LPS por 24 horas, quando comparado com o grupo tratado com LPS por 6 horas, bem como houve diferença significativa nos valores de efeito máximo de contração em relação aos animais tratados com LPS por 6 horas.

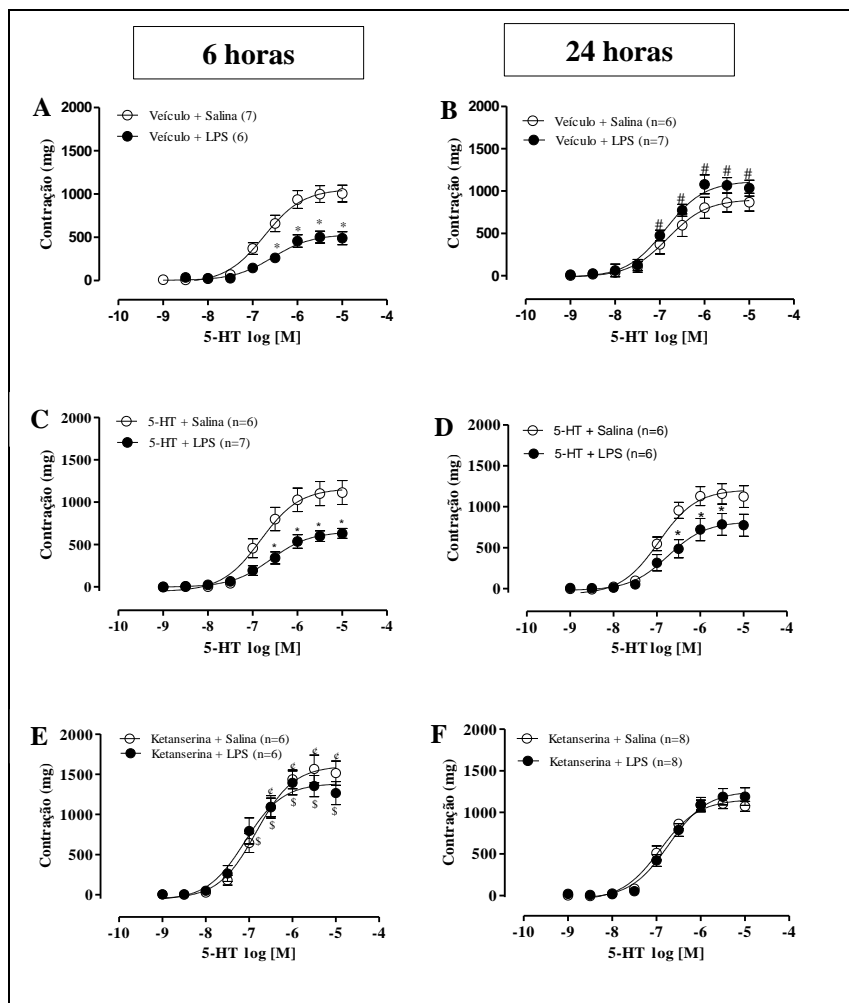
A **figura 2C** mostra os resultados obtidos nos grupos que receberam tratamento com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1 mL/Kg) após o pré-tratamento com 5-HT (2 mgL/Kg) e tiveram sua reatividade vascular avaliada após 6 horas do tratamento. A administração de concentrações

crescentes de 5-HT induziu resposta contrátil dependente da concentração nos 2 grupos experimentais. A eficácia da 5-HT em induzir contração na veia jugular de ratos foi significativamente menor no grupo que recebeu tratamento com LPS quando comparado àquele que recebeu salina (**tabela 3**). Comparados ao mesmo tratamento, o pré-tratamento com 5-HT não alterou a resposta contrátil induzida por 5-HT em veia jugular de ratos quando comparado ao pré-tratamento com veículo.

Como é possível observar na **figura 2D**, foi avaliada a reatividade vascular após 24 horas do tratamento dos grupos que receberam LPS (10 mg/Kg) ou salina (1 mL/Kg) após o pré-tratamento com 5-HT (2 mg/Kg). Avaliando as CCR, observamos diferença significativa entre elas, embora não tenha sido observada diferença significativa na eficácia da 5-HT em causar contração, como é possível observar na **tabela 3**. Também não foi observada diferença significativa entre os tempos de tratamento (6 e 24 horas) com LPS e com salina nos animais que receberam como pré-tratamento 5-HT.

Para avaliar se a ketanserina possui papel protetor no choque endotoxêmico, realizamos CCR para 5-HT em veia jugular de ratos pré-tratados com ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas. Como é possível observar na **figura 2E**, não houve diferença significativa na CCR induzida por 5-HT em veia jugular de ratos pré-tratados com ketanserina após 6 horas do tratamento com LPS ou salina. No entanto houve diferença significativa quando comparamos a CCR induzida por 5-HT em veia jugular de animais que receberam ketanserina seguido de LPS com aquela obtida em veia jugular de animais que receberam veículo seguido de LPS, com alteração da eficácia. E ainda, houve diferença significativa quando comparadas as CCR induzidas por 5-HT em veia jugular dos animais que receberam veículo seguido de salina com os animais que receberam ketanserina seguido de salina, ocorrendo uma potencialização no efeito contrátil da 5-HT para o segundo grupo.

Na **figura 1F** é possível observar a reatividade contrátil das veias jugulares induzidas por 5-HT de animais que foram tratados com LPS não foi diferente daquela de animais que foram tratados com salina após pré-tratamento com ketanserina.



**Figura 2 - Curvas concentração resposta para 5-HT em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.** Anéis de veia jugular de ratos tratados com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1mL/Kg) após 5 minutos do pré-tratamento com veículo (1mL/Kg) (A e B), 5-HT (C e D) e ketanserina (E e F). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da resposta obtida em mg de contração. (n) \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. veículo + LPS 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). \$ representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) vs. veículo + LPS 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). € representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) vs. veículo + salina 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni).



**Tabela 3:** Valores de efeito máximo de contração em miligramas obtidos nas CCR para 5-HT para os grupos que receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.

Horas após tratamento	Tratamento	EM contração (mg)
6 horas	Veículo + Salina	1068 ± 97,0 (7)
	Veículo + LPS	538,5 ± 74,1* (6)
	5-HT + salina	1177 ± 147,2 (7)
	5-HT + LPS	693,2 ± 66,5* (7)
	Ketanserina + Salina	1619 ± 169,7 <sup>e</sup> (6)
	Ketanserina + LPS	1397 ± 139,1 <sup>s</sup> (6)
24 horas	Veículo + Salina	915,9 ± 106,5 (7)
	Veículo + LPS	1119 ± 98,7 <sup>#</sup> (6)
	5-HT + salina	1210 ± 133,6 (6)
	5-HT + LPS	826,5 ± 135,5 (6)
	Ketanserina + Salina	1163 ± 60,5 (8)
	Ketanserina + LPS	1272 ± 102,6 (8)

(\*)  $p < 0,05$  vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t pareado); (<sup>#</sup>)  $P < 0,05$  vs. Veículo + LPS por 6 horas (teste t pareado); (<sup>e</sup>)  $p < 0,05$  vs. Veículo + Salina 6 horas (teste t pareado); (<sup>s</sup>)  $p < 0,05$  vs. Veículo + LPS 6 horas (teste t pareado) (n). EM: efeito máximo de contração.

#### **4.2.2. Avaliação da resposta induzida por acetilcolina em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado depois do pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina**

Para avaliar os efeitos da administração de LPS no relaxamento da veia jugular de ratos foram realizadas CCR induzidas por acetilcolina (ACh) após contração prévia com 5-HT em diferentes anéis de veia jugular após 6 e 24 horas do tratamento com LPS e comparadas com aquelas obtidas no grupo que recebeu salina no lugar de LPS.

A **figura 3A** mostra o relaxamento induzido por acetilcolina em veia jugular de ratos que receberam veículo como pré-tratamento antes do tratamento com LPS ou com salina por 6 horas. Houve aumento na eficácia da acetilcolina em causar relaxamento em anéis de veia jugular de ratos tratados com LPS quando comparados aos tratados com salina (**tabela 4**).

Ao avaliarmos a resposta relaxante das veias jugulares dos animais pré-tratados com veículo seguido do tratamento com LPS ou salina por 24 horas, não observamos diferença significativa na eficácia da acetilcolina em causar relaxamento, como podemos observar na **figura 3B**. No entanto, a CCR induzida por acetilcolina, bem como a eficácia da acetilcolina em induzir relaxamento de veia jugular de ratos tratados por 24 horas com LPS foram diferentes das observadas quando o tempo de tratamento com LPS foi de 6 horas.

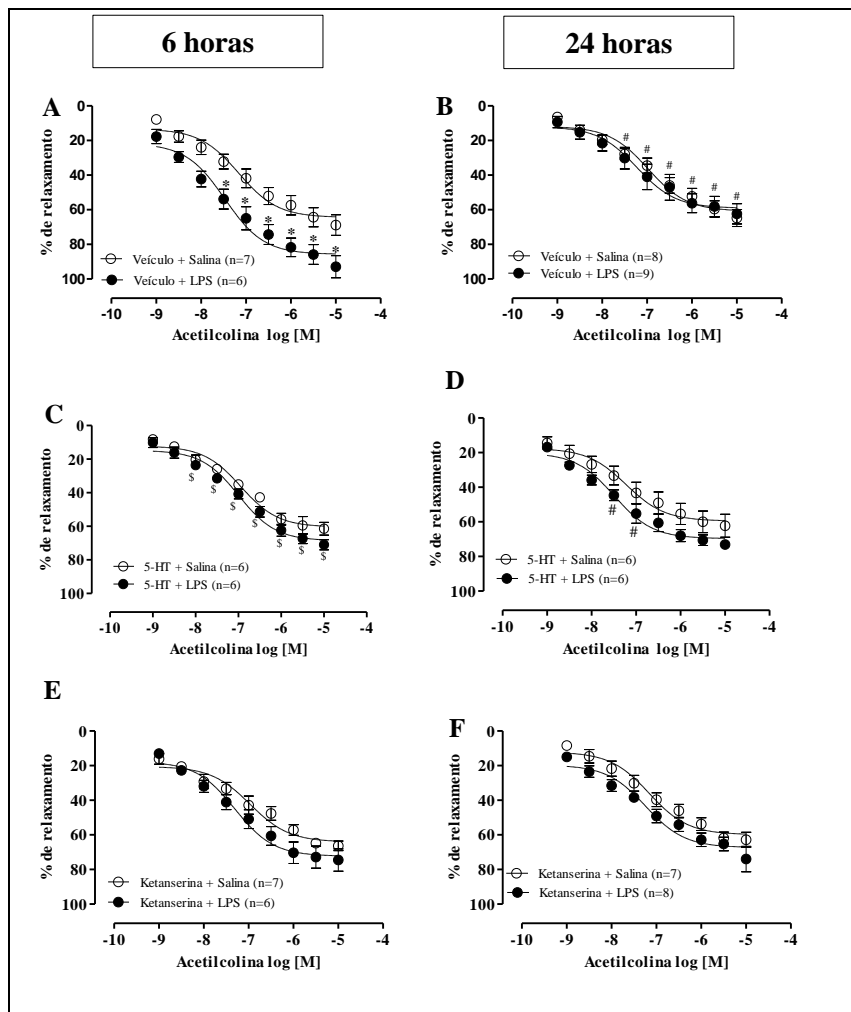
Com a finalidade de avaliar o relaxamento da veia jugular frente ao pré-tratamento com 5-HT em animais tratados com LPS ou salina, foram construídas CCR para acetilcolina 6 horas após o tratamento. Como podemos observar na **figura 3C** e na **tabela 4**, em veia jugular de animais pré-tratados com 5-HT, o tratamento com LPS não alterou o relaxamento induzido por acetilcolina quando comparado aos animais tratados com salina. Quando comparamos com os resultados obtidos em veia jugular de animais pré-tratados com veículo, o tratamento por 6 horas com LPS foi menor no grupo pré-tratado com 5-HT.

O pré-tratamento com 5-HT não alterou a CCR da acetilcolina na veia jugular de ratos tratados por 24 horas com LPS quando comparada à CCR obtida em veia jugular de animais tratados com salina pelo mesmo período, como podemos observar na **figura 3D**. Enquanto não observamos diferença nos valores de efeito máximo induzidos por

acetilcolina em veia jugular de animais pré-tratados com 5-HT e tratados com LPS ou salina por 24 horas quando comparados aos mesmos tratamentos por 6 horas, observamos diferença em dois pontos da CCR induzida por acetilcolina entre os grupos tratados com LPS.

Como é possível observar na **figura 3E**, quando comparamos as CCR induzidas por acetilcolina em veia jugular de animais que receberam ketanserina seguido de LPS com os que receberam ketanserina seguido de salina não observamos diferença significativa entre as curvas.

Da mesma maneira, após 24 horas do tratamento com LPS ou salina precedidos pelo pré-tratamento com ketanserina, não observamos diferença na resposta relaxante induzida por acetilcolina em veia jugular de ambos os grupos, como podemos observar na **figura 3F**.



**Figura 3: Curvas concentração resposta para acetilcolina em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.** Anéis de veia jugular de ratos tratados com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1mL/Kg) após 5 minutos do pré-tratamento com veículo (1mL/Kg) (A e B), 5-HT (C e D) e ketanserina (E e F). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da resposta obtida em percentagem de relaxamento de n experimentos. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. veículo + LPS por 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). § representa diferença

significativa ( $P < 0,05$ ) vs. Veículo + LPS por 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni).

**Tabela 4:** Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para acetilcolina para os grupos que receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.

Horas após tratamento	Tratamento	EM porcentagem de relaxamento (%)
6 horas	Veículo + Salina	64,8 ± 5,1 (7)
	Veículo + LPS	87,0 ± 5,7* (6)
	5-HT + salina	60,8 ± 4,8 (6)
	5-HT + LPS	69,3 ± 4,1 <sup>\$</sup> (6)
	Ketanserina + Salina	65,5 ± 1,9 (7)
	Ketanserina + LPS	72,6 ± 6,1 (6)
24 horas	Veículo + Salina	61,3 ± 4,4 (8)
	Veículo + LPS	61,9 ± 5,3 <sup>#</sup> (9)
	5-HT + salina	60,0 ± 6,1 (6)
	5-HT + LPS	70,5 ± 3,2 (6)
	Ketanserina + Salina	60,5 ± 3,4 (7)
	Ketanserina + LPS	69,8 ± 4,8 (6)

(\*)  $p < 0,05$  vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t pareado); (<sup>#</sup>)  $P < 0.05$  vs. Veículo + LPS por 6 horas (teste t pareado); (<sup>\$</sup>)  $P < 0.05$  vs. Veículo + LPS por 6 horas (teste t pareado) (n). EM: efeito máximo de relaxamento

#### 4.2.3. Avaliação da resposta induzida por nitroprussiato de sódio em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após o pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina

Para melhor elucidar os efeitos da administração de LPS sobre o relaxamento da veia jugular de ratos, foram realizadas CCR para

nitroprussiato de sódio (NPS) após 6 e 24 horas de administração de LPS e comparadas àquelas obtidas em ratos que receberam salina ou LPS.

Na **figura 4A** podemos observar que o nitroprussiato de sódio foi mais eficaz em relaxar veia jugular de ratos pré-tratados com veículo e tratados com LPS por 6 horas do que de ratos tratados com salina. Observamos diferença na eficácia do nitroprussiato de sódio em causar relaxamento nos animais tratados com LPS quando comparados aos tratados com salina (**tabela 5**).

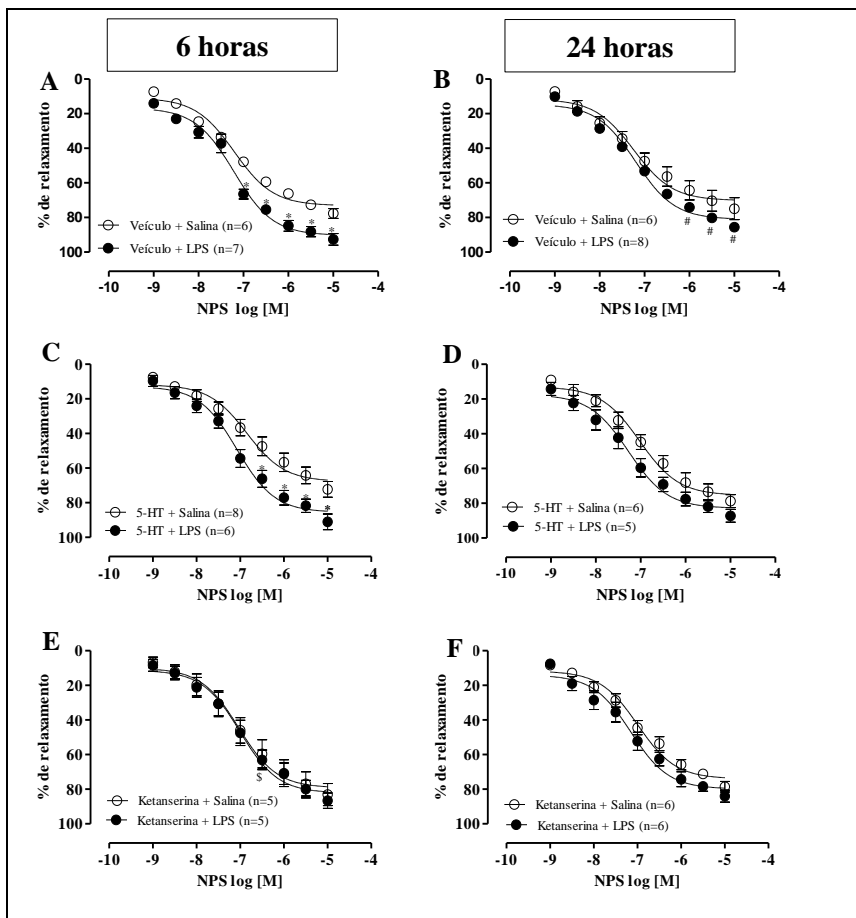
Diferentemente do observado após 6 horas de tratamento com LPS ou salina após pré-tratamento com veículo, não observamos diferença no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio em veia jugular de ratos que receberam LPS ou salina por 24 horas (**Figura 4B**). No entanto, a CCR e o relaxamento induzido por NPS em veia jugular de ratos que receberam LPS por 24 horas foi diferente do observado quando o tratamento com LPS foi por 6 horas.

Na **figura 4C** podemos observar que o nitroprussiato de sódio foi mais eficaz em relaxar veia jugular de ratos tratados com LPS por 6 horas que receberam 5-HT como pré-tratamento do que de ratos tratados com salina pelo mesmo período e com o mesmo pré-tratamento. O pré-tratamento com 5-HT não alterou a CCR induzida por nitroprussiato de sódio em veia jugular de ratos tratados por 6 horas com LPS ou salina quando comparado ao pré-tratamento com veículo.

Em 24 horas após os tratamentos com LPS ou salina, não observamos diferença nas CCR induzidas por nitroprussiato de sódio em veia jugular dos animais que foram pré-tratados com 5-HT (**figura 4D**).

A resposta relaxante de veias jugulares de ratos, induzida por nitroprussiato de sódio, após 6 horas dos tratamentos com LPS ou salina, precedidos do pré-tratamento com ketanserina, não apresentou diferença significativa entre os grupos avaliados, no entanto em um dos pontos da curva, apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo pré-tratados com veículo (6 horas), como é possível observar na **figura 4E**.

Semelhante ao observado em 6 horas, o relaxamento induzido por nitroprussiato em veias jugulares de ratos tratados com LPS ou salina por 24 horas após pré-tratamento com ketanserina não apresentou diferença significativa entre os grupos, assim como quando comparado com o grupo pré-tratado com veículo (24 horas), como é possível observar na **figura 4F**.



**Figura 4 - Curvas concentração resposta para nitroprussiato de sódio (NPS) em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS.** Anéis de veia jugular de ratos tratados com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1mL/Kg) após 5 minutos do pré-tratamento com veículo (1mL/Kg) (A e B), 5-HT (C e D) e ketanserina (E e F). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da resposta obtida em percentagem de relaxamento de n experimentos. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. veículo + LPS por 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni). § representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) vs. Veículo + LPS por 6 horas (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni).

**Tabela 5:** Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para nitroprussiato de sódio para os grupos receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.

Horas após tratamento	Tratamento	EM porcentagem de relaxamento (%)
6 horas	Veículo + Salina	73,2 ± 2,4 (6)
	Veículo + LPS	90,1 ± 2,8 * (7)
	5-HT + salina	68,6 ± 4,2 (8)
	5-HT + LPS	85,9 ± 3,9 * (6)
	Ketanserina + Salina	79,7 ± 6,5 (5)
	Ketanserina + LPS	83,4 ± 4,1 (5)
24 horas	Veículo + Salina	70,3 ± 5,8 (6)
	Veículo + LPS	81,2 ± 1,6 <sup>#</sup> (8)
	5-HT + salina	75,7 ± 4,3 (6)
	5-HT + LPS	83,2 ± 3,3 (5)
	Ketanserina + Salina	74,7 ± 2,6 (6)
	Ketanserina + LPS	80,4 ± 2,7 (6)

(\*)  $p < 0,05$  vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t pareado); (<sup>#</sup>)  $P < 0.05$  vs. Veículo + LPS por 6 horas (teste t pareado); (n). EM: efeito máximo de relaxamento



#### **4.2.4. Avaliação da resposta induzida por noradrenalina em veia jugular de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após o pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina**

Sabendo que na clínica a droga de escolha para reverter o quadro de choque é a noradrenalina e lembrando que em veias jugular a noradrenalina tem efeitos relaxantes, foram construídas CCR induzidas por noradrenalina após 6 e 24 horas da administração de LPS e salina 5 minutos após os pré tratamentos com veículo, 5-HT e ketanserina.

Como observado na **figura 5A**, em 6 horas após o tratamento com LPS precedido de veículo as veias jugulares apresentaram uma hiper-rensponsividade no relaxamento obtido pela noradrenalina em comparação aos animais que receberam apenas salina precedido de veículo.

Diferente do observado anteriormente, quando comparamos as CCR para noradrenalina após 24 horas de administração LPS ou salina após o pré-tratamento com veículo, não observamos diferença significativa entre os tratamentos, como é possível observar na **figura 5B**.

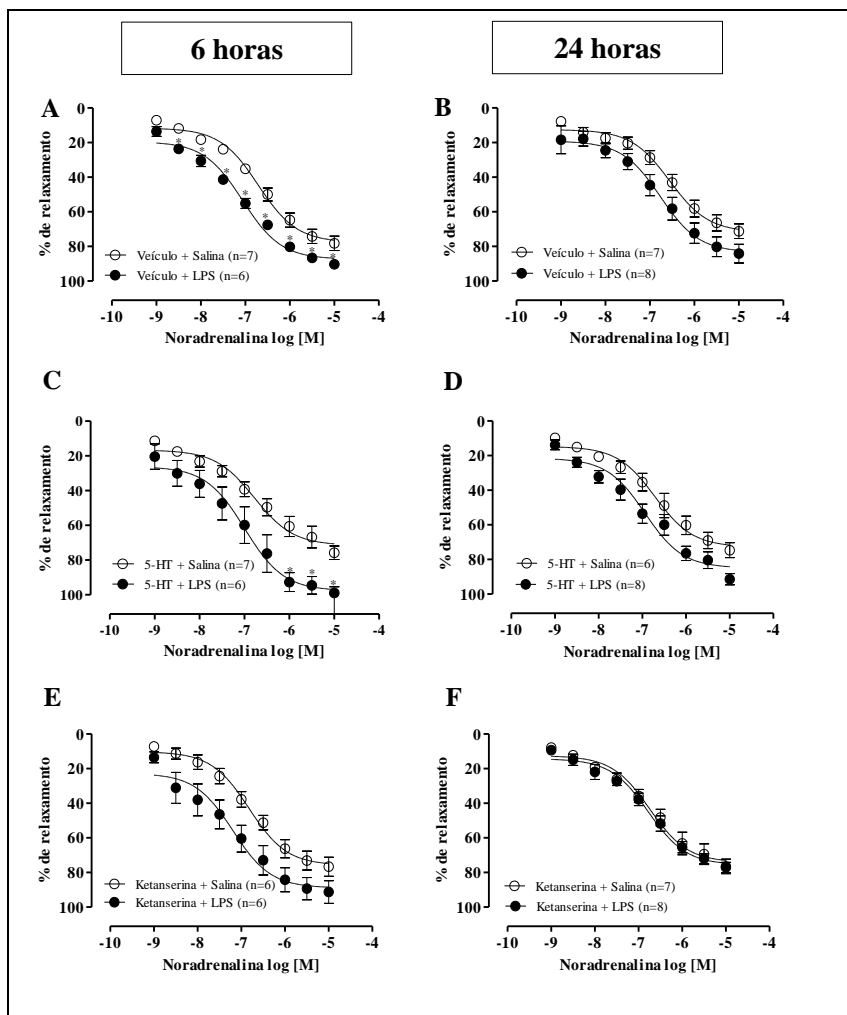
A **figura 5C** mostra que a noradrenalina induz relaxamento dependente da concentração em veia jugular de ratos tratados por 6 horas com LPS ou salina e que foram pré-tratados com 5-HT. Em ratos pré-tratados com 5-HT, o relaxamento induzido por noradrenalina foi maior em veia jugular daqueles que receberam LPS como tratamento do que os que receberam salina. No entanto, quando comparado ao pré-tratamento com veículo, o pré-tratamento com 5-HT não foi eficaz em modificar a resposta relaxante induzida por noradrenalina em veia jugular de ratos tratados por 6 horas com LPS ou salina.

A **figura 5D** mostra que a resposta relaxante induzida por noradrenalina não foi diferente entre veia jugular de ratos pré-tratados com 5-HT e tratados com LPS ou salina por 24 horas. No entanto, a **tabela 6** mostra que houve diferença significativa no efeito máximo relaxante induzido pela noradrenalina.

A **figura 5E** mostra que a noradrenalina induz relaxamento dependente da concentração em veia jugular de ratos tratados por 6 horas com LPS ou salina e que foram pré-tratados com ketanserina. O relaxamento induzido por noradrenalina não apresentou diferença significativa nas CCR daqueles que receberam LPS como tratamento do que os que receberam salina. Assim como quando comparado ao pré-tratamento com veículo, o pré-tratamento com ketanserina não foi eficaz

em modificar a resposta relaxante induzida por noradrenalina em veia jugular de ratos tratados por 6 horas com LPS ou salina.

Assim como em 6 horas a resposta relaxante induzida por noradrenalina não foi diferente entre veia jugular de ratos pré-tratados com ketanserina e tratados com LPS ou salina por 24 horas (**figura 5F**).



**Figura 5 -** Curvas concentração resposta para noradrenalina em veia jugular de ratos após 6 e 24 horas do tratamento com LPS. Anéis de veia jugular de ratos tratados com LPS (10 mg/Kg) ou salina (1mL/Kg) após 5 minutos do pré-tratamento com veículo (1mL/Kg) (A e B), 5-HT (C e D) e ketanserin (E e F). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da resposta obtida em percentagem de relaxamento de n experimentos. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni).

**Tabela 6:** Valores de efeito máximo em porcentagem de relaxamento obtidos nas CCR para noradrenalina para os grupos receberam pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina antes do tratamento com LPS ou salina por 6 e 24 horas.

<b>Horas após tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>EM porcentagem de relaxamento (%)</b>
<b>6 horas</b>	Veículo + Salina	78,1 ± 4,2 (7)
	Veículo + LPS	87,5 ± 2,7 (8)
	5-HT + salina	72,6 ± 5,3 (7)
	5-HT + LPS	107,1 ± 9,8* (6)
	Ketanserina + Salina	76,1 ± 5,5 (6)
	Ketanserina + LPS	90,6 ± 6,2 (6)
<b>24 horas</b>	Veículo + Salina	72,1 ± 4,1 (7)
	Veículo + LPS	83,9 ± 5,0 (8)
	5-HT + salina	74,3 ± 4,2 (6)
	5-HT + LPS	87,2 ± 2,4* (7)
	Ketanserina + Salina	75,3 ± 4,5 (7)
	Ketanserina + LPS	76,1 ± 2,7 (8)

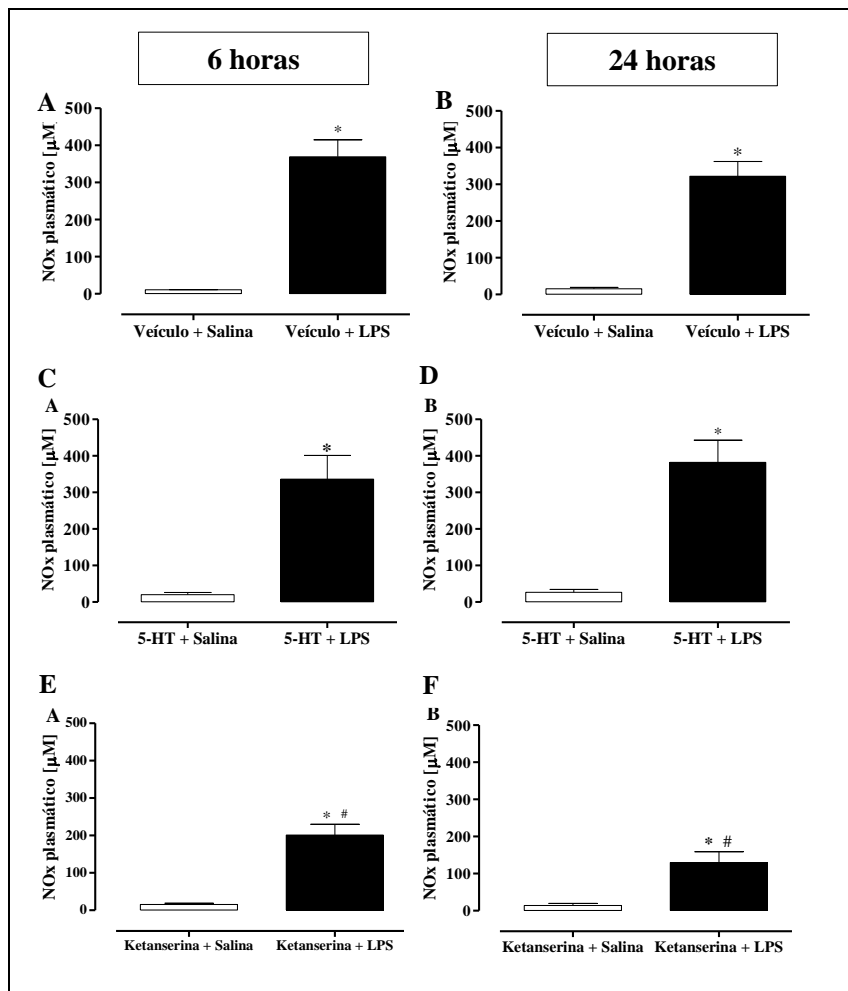
(\*)  $p < 0,05$  vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t pareado). (n). EM: efeito máximo de relaxamento

#### **4.3. Dosagem de NOx plasmático de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina realizado após o pré-tratamento com veículo, 5-HT ou ketanserina**

Nesta parte serão apresentados os resultados das dosagens de NOx plasmático obtidos em amostras de sangue coletadas após 6 e 24 horas da realização dos tratamentos com LPS ou salina em animais que foram pré-tratados com veículo, 5-HT ou ketanserina.

Observamos um aumento significativo na concentração plasmática de NOx nas amostras dos animais tratados com LPS em todos os grupos experimentais, no entanto nos animais pré-tratados com ketanserina esse aumento foi menor do que nos outros grupos tanto em 6

horas (**figura 6A**) quanto em 24 horas (**figura 6B**).



**Figura 6 - Dosagem plasmática de NOx após 6 horas e 24 horas do tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo (A e B), 5-HT (C e D) ou ketanserina (E e F) como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 amostras distintas. \*  $p < 0,05$ , vs. Animais do mesmo grupo tratados com salina (teste t de Student). #  $p < 0,05$  vs. veículo + LPS (teste t de Student).

#### **4.4. Hemograma de animais tratados com LPS e salina veículo, 5-HT ou ketanserina seguido de LPS ou veículo por 6 e 24 horas**

No hemograma, os resultados das contagens de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio e hematócrito não apresentaram diferença significativa entre todos os grupos experimentais (dados não mostrados).

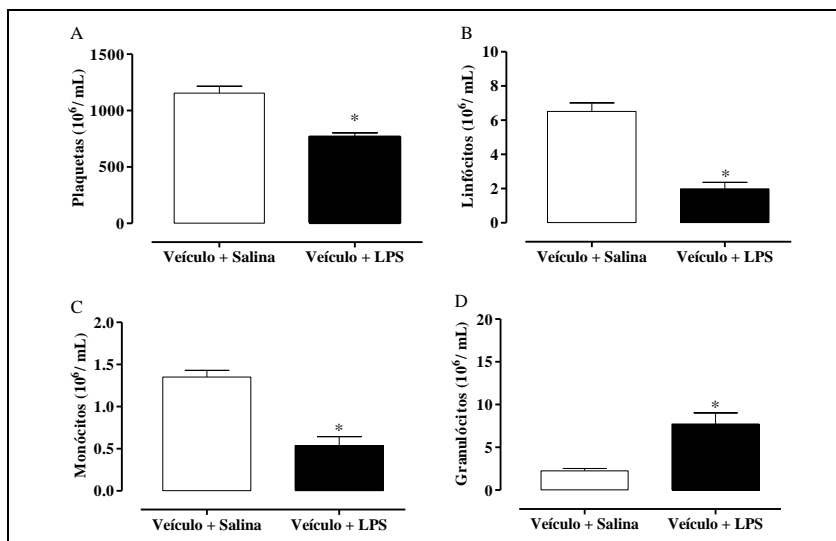
Apresentaremos nesta parte a contagem de plaquetas, linfócitos, monócitos e granulócitos obtida nas amostras de animais dos grupos experimentais. Será dividida em 3 seções, sendo que cada uma apresentará os resultados obtidos em um dos três pré-tratamentos realizados (veículo, 5-HT ou ketanserina) 5 minutos antes dos tratamentos com LPS ou salina. As amostras foram obtidas 6 e 24 horas após os tratamentos.

As figuras dessa parte apresentarão os gráficos mostrando resultados obtidos de plaquetas em **A**, de linfócitos em **B**, de monócitos em **C** e de granulócitos em **D**.

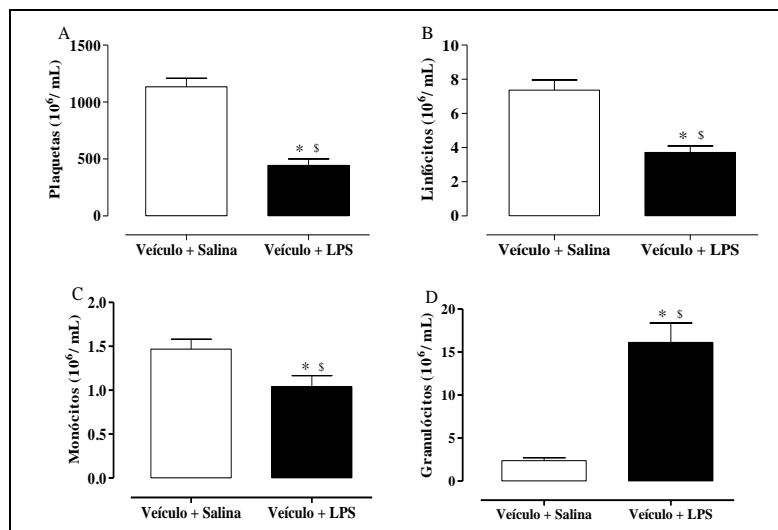
##### **4.4.1. Contagem celular em amostras de animais tratados com LPS ou salina por 6 e 24 horas**

Os animais foram tratados com LPS (10 mg/kg) ou salina (1 ml/kg) por 6 e 24 horas após o pré-tratamento com veículo (1ml/kg) realizados 5 min antes dos tratamentos.

Como podemos observar o tratamento com LPS por 6 horas (figura 7) e por 24 horas (figura 8) induziu uma diminuição significativa no número de plaquetas (A), linfócitos (B) e monócitos (C) bem como um aumento significativo no número de granulócitos (D) quando comparados ao tratamento com salina entre os animais que receberam veículo como pré-tratamento.



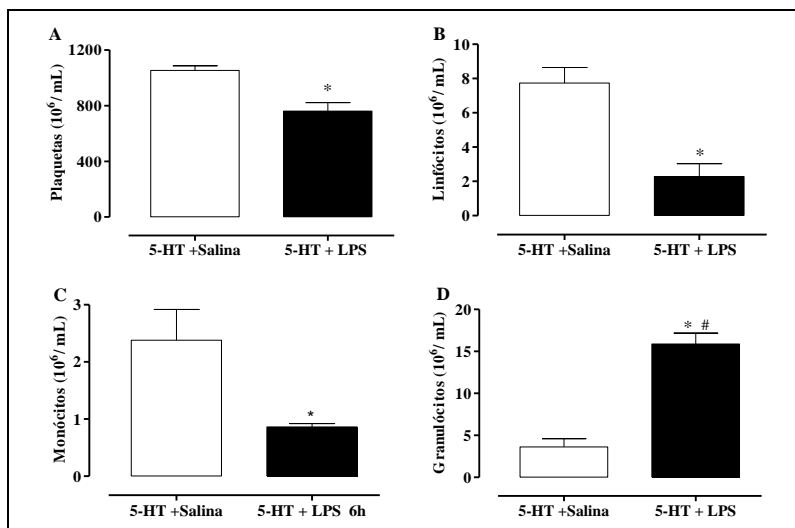
**Figura 7 - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo como pré-tratamento.** A contagem de células foi realizada por método automatizado. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \*  $p < 0,05$ , vs. Veículo + salina (teste t de Student).



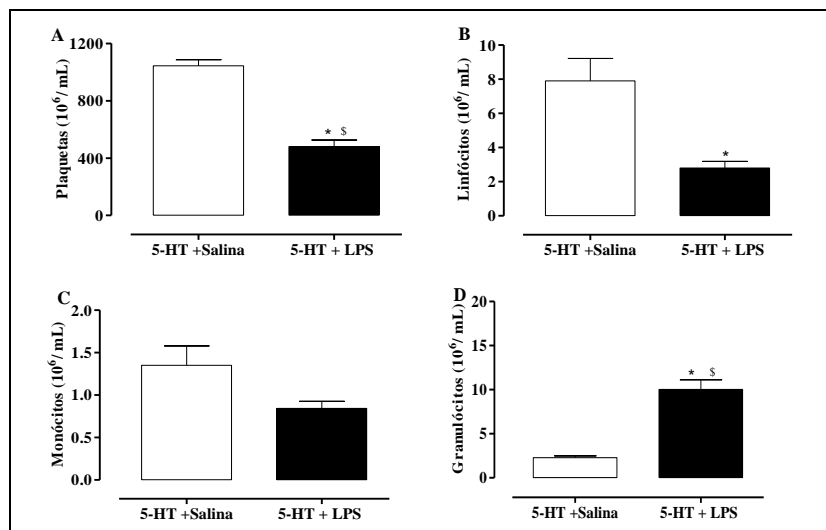
**Figura 8 - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam veículo como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \* p < 0,05, vs. Veículo + salina (teste t de Student). <sup>s</sup> p < 0,05 vs. Veículo + LPS 6 horas (teste t de Student).

O tratamento com LPS por 6 horas (figura 9) e por 24 horas (figura 10) induziu uma diminuição significativa no número de plaquetas (A), linfócitos (B) e monócitos (C) bem como um aumento significativo no número de granulócitos (D) quando comparados ao tratamento com salina entre os animais que receberam 5-HT como pré-tratamento. O pré-tratamento dos animais com 5-HT não alterou significativamente a contagem celular quando comparado com os resultados obtidos em animais pré-tratados com veículo em 24 horas e em 6 horas apresentou aumento significativo na contagem de granulócitos quando comparado aos animais que receberam pré-tratamento com veículo. Plaquetas e granulócitos apresentaram diminuição significativa quando comparados animais que receberam pré-tratamento com 5-HT e tratamento com LPS por 24 horas aos animais que receberam pré-tratamento com 5-HT e tratamento com LPS por 6 horas.



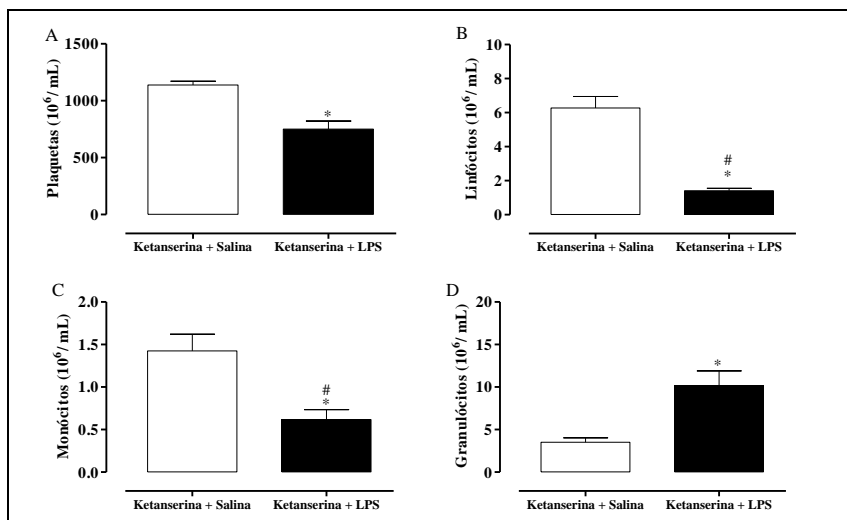


**Figura 9 - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam 5-HT como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \*  $p < 0,05$ , vs. 5-HT + salina (teste t de Student). #  $p < 0,05$  vs. veículo + LPS (teste t de Student).

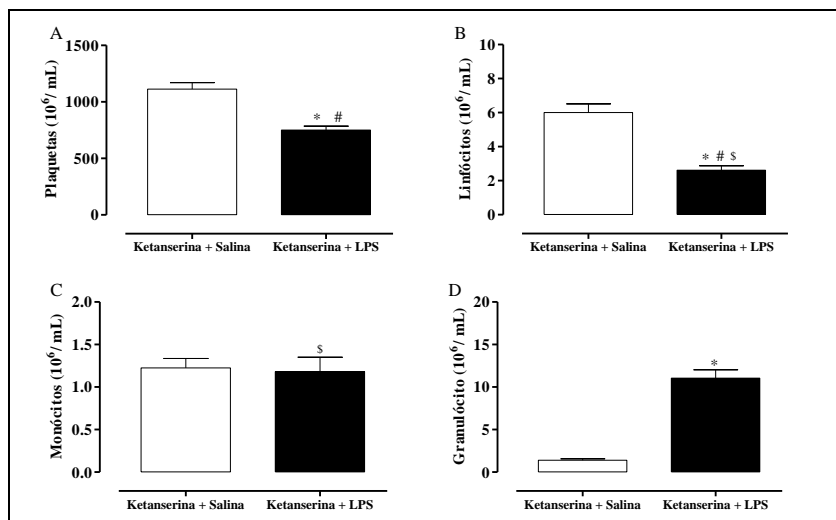


**Figura 10 - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam 5-HT como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \*  $p < 0,05$ , vs. 5-HT + salina (teste t de Student). §  $p < 0,05$  vs. 5-HT + LPS 6 horas (teste t de Student).

O tratamento com LPS por 6 horas (figura 11) e por 24 horas (figura 12) induziu uma diminuição significativa no número de plaquetas (A), linfócitos (B) e monócitos (C) bem como um aumento significativo no número de granulócitos (D) quando comparados ao tratamento com salina entre os animais que receberam ketanserina como pré-tratamento. O pré-tratamento dos animais com ketanserina alterou significativamente a contagem celular para linfócitos e monócitos em 6 horas e plaquetas e linfócitos em 24 horas, quando comparado com os resultados obtidos em animais pré-tratados com veículo.



**Figura 11 - Hemograma realizado 6 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam ketanserina como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \*  $p < 0,05$ , vs. 5-HT + salina (teste t de Student). #  $p < 0,05$  vs. veículo + LPS (teste t de Student).



**Figura 12 - Hemograma realizado 24 horas após o tratamento com LPS e salina em animais que receberam ketanserin como pré-tratamento.** Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da contagem de plaquetas (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e granulócitos (D) de 5 a 8 amostras. \*  $p < 0,05$ , vs. 5-HT + salina (teste t de Student). #  $p < 0,05$  vs. veículo + LPS (teste t de Student). \$  $p < 0,05$  vs. 5-HT + LPS 6 horas (teste t de Student).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Pré-tratamento com veículo

A sepse é caracterizada por uma infecção, associada a resposta inflamatória sistêmica, podendo evoluir para sepse severa e ainda para o choque séptico (CASTELLHEIM et al., 2009). Apesar de existirem muitos estudos acerca de novos tratamentos e formas de diagnóstico, a sepse é um desafio clínico, uma vez que ainda é uma das maiores doenças causadoras de morte em UTIs. Por isso, existem inúmeras possibilidades para estudar e entender mais sobre esta doença.

O modelo experimental de sepse utilizado neste trabalho foi a administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos machos, que mimetiza alguns dos sintomas de sepse e choque séptico, desencadeando uma variedade de respostas no organismo (ZIVOT e HOFFMAN, 1995). Neste estudo, foram avaliados alguns parâmetros descritos na literatura que caracterizam o choque endotoxêmico. Visto que as principais características cardiovasculares presentes em ratos com endotoxemia induzida por este modelo são pressão arterial média diminuída e frequência cardíaca aumentada (BRACKETT et al., 1985), esses parâmetros foram avaliados por pletismografia de cauda. Observamos que a administração intraperitoneal de LPS causou uma queda na pressão arterial, acompanhada de aumento da frequência cardíaca, características do choque endotoxêmico.

A queda na pressão arterial foi observada logo nas primeiras 3 horas da administração do LPS e permaneceu abaixo dos níveis pressóricos normais observados nos animais tratados com salina até 24 horas após sua administração, retornando aos níveis basais em 48 horas da administração de LPS. Estes dados confirmam os dados da literatura que demonstram que esse modelo experimental de sepse desencadeia um processo agudo de infecção. Observamos uma queda na pressão arterial de aproximadamente 16 mmHg nos animais tratados com LPS. Esta queda não foi tão acentuada se compararmos com os dados observados por Guarido e colaboradores (2014), onde a queda na pressão arterial após 6 horas do tratamento com LPS chega a 25 mmHg (GUARIDO et al., 2014). Essa diferença pode estar relacionada aos métodos escolhidos nos dois estudos. Em nosso estudo o rato está acordado e a medida é indireta e não invasiva, enquanto que nos demais estudos encontrados na literatura, a medida de pressão arterial geralmente é realizada pela medida direta invasiva. Ambos os métodos apresentam pontos positivos e

negativos, sendo que o método de medida de pressão não invasiva apresenta a vantagem de não ter a influência de anestésicos sobre a pressão arterial dos animais, além de ser possível acompanhar a evolução da pressão arterial ao longo do tempo em um mesmo animal.

Um dado curioso que observamos em nosso estudo é de que os ratos que receberam tratamento com LPS apresentaram a frequência cardíaca aumentada (até 72 horas após o tratamento), mesmo depois da pressão arterial ter voltado a níveis pressóricos semelhantes aos dos animais que receberam salina. Há dados da literatura que afirmam que o aumento da frequência cardíaca é um mecanismo compensatório do organismo para tentar recuperar a queda observada na pressão arterial (BARNABY et al., 2002). No entanto, em nossos experimentos, apesar da pressão arterial ter voltado aos níveis basais em 48 horas, não foi acompanhado pela recuperação dos níveis basais da frequência cardíaca. A pressão arterial depende do débito cardíaco e resistência vascular periférica (GUYTON, 1991), e o débito cardíaco é dependente também da frequência cardíaca. Portanto, nossos dados sugerem que apesar da pressão arterial ter voltado a níveis basais, alguma sequela cardíaca fez com que a frequência cardíaca continuasse aumentada. Em dados publicados recentemente, animais tratados com LPS apresentaram queda significativa na pressão arterial após 6 horas do tratamento, retornando aos níveis de pressão arterial basal em 24 horas, enquanto que a frequência cardíaca permaneceu aumentada até 24 horas (GONÇALVES et al., 2014). Este e outros trabalhos da literatura demonstram depressão miocárdica causada pela sepse (CELES, PRADO e ROSSI, 2013; GONÇALVES et al., 2014). Relatos da literatura em que ratos foram tratados com a mesma dose de LPS utilizada em nosso estudo e pressão arterial e frequência cardíaca foram avaliados até 72 horas após o tratamento, demonstraram que frequência cardíaca esteve aumentada e pressão arterial esteve diminuída até 48 horas após a administração de LPS e em 72 horas voltaram para os níveis basais (LEE et al., 2002).

Outro parâmetro que avaliamos foi a dosagem de NO de forma indireta pelo método de Griess, que também é uma medida para confirmação da efetividade do tratamento com LPS em induzir o quadro endotoxêmico. O resultado que obtivemos foi um aumento significativo de NO plasmático tanto em 6 quanto em 24 horas após o tratamento com LPS comparado ao tratamento com salina. Esses dados estão de acordo com relatos da literatura que demonstram que o LPS é capaz de induzir um aumento da produção de NO (GONÇALVES et al., 2014; KILBOURN et al., 1990). Além disso, esse excesso de NO produzido na sepse está associado com a pressão arterial diminuída dos animais que

receberam LPS (KILBOURN et al., 1990). A relação entre NO e sepse vem sendo avaliada há muitos anos (KILBOURN, 1998). Inflamação e produtos bacterianos, tais como lipopolissacarídeo e citocinas são conhecidos como fatores estimulantes da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS). O NO produzido em excesso desempenha um papel destrutivo aos patógenos e vasodilatação excessiva, sendo que ambos são elementos cruciais para a fisiopatologia da sepse (ALDEN et al., 1998). Estes dados levaram à formação da hipótese de que a redução do excesso de produção de NO em pacientes com sepse e choque séptico poderia ser benéfico. Infelizmente, um ensaio clínico no qual um inibidor não seletivo de iNOS (N3-monometil-L-arginina) foi usado, não resultou em melhora no quadro dos pacientes e foi interrompido prematuramente devido ao excesso de mortalidade no grupo tratado (LÓPEZ et al., 2004). Estes achados demonstram que a fisiopatologia da sepse vai além da produção excessiva de NO.

Em nosso estudo demonstramos aumento na contagem de granulócitos, e diminuição na contagem de linfócitos, monócitos e plaquetas tanto em 6 quanto em 24 horas após o tratamento com LPS. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura (GONÇALVES et al., 2014), confirmando mais uma vez que a administração de LPS foi capaz de induzir um choque endotoxêmico nos animais estudados. Dados na literatura mostram que a contagem diminuída de plaquetas na sepse pode ser devido a hemorragias ou coagulação intravascular disseminada (VINCENT, YAGUSHI e PRADIER, 2002). Por outro lado, estudos demonstram que níveis de apoptose em linfócitos estão aumentados enquanto que a apoptose de neutrófilos está diminuída na sepse, o que pode contribuir para uma diminuição e aumento em suas contagens, respectivamente, como o observado em nosso estudo (AYALA et al., 2007; HOTCHKISS e NICHOLSON, 2006).

A hiporreatividade vascular frente a agentes vasoconstritores na sepse ou choque endotoxêmico já é bem descrita na literatura. O experimento de medidas de tensão isométrica de veia jugular de ratos tratados com LPS demonstrou que este vaso tem comportamento parecido com os demais vasos já relatados na literatura, como a aorta de rato (SILVA-SANTOS, TERLUK e ASSREUY, 2002), artéria mesentérica de rato (ZHANG et al., 2014) e a veia safena de coelho (VAYSSETTES-COURCHAY et al., 2003). As veias jugulares de ratos apresentaram-se hiporreativas frente ao agente constritor, com alteração na eficácia da 5-HT em causar contração em 6, mas não em 24 horas após o tratamento com LPS. Esses resultados vão de encontro a estudos que mostram que

neste modelo de sepse alguns leitos vasculares ainda se apresentam hiporreativos após 24 horas do tratamento, como o observado em aorta de rato (SORRENTINO et al., 1999), e em artéria mesentérica de ratos (SILVA-SANTOS, et al., 2009). Ressaltamos a importância de estudarmos a reatividade de veias na sepse, uma vez que essas são negligenciadas nos estudos envolvendo esta e outras patologias cardiovasculares. É importante lembrar que as veias são responsáveis por levar o sangue dos tecidos de volta para o coração, sendo que o tônus da musculatura lisa das veias influencia diretamente a capacitância vascular, que por sua vez influencia a pressão de enchimento circulatório e por consequência o retorno venoso, o volume sistólico, débito cardíaco e por fim a pressão arterial (KUROI, FINK e OSBORN, 2014). Por isso o estado contrátil das veias é de suma importância para o controle da pressão arterial, pois determina o retorno venoso. Desta maneira, a hipocontratilidade dos leitos venosos leva a uma deficiência do retorno venoso, prejudicando o reestabelecimento da pressão arterial. A recuperação da resposta contrátil de veia jugular (após 24 horas do tratamento) aconteceu antes da recuperação da pressão arterial (após 48 horas do tratamento), sugerindo que o reestabelecimento da função venosa, portanto do retorno venoso, precede o reestabelecimento da pressão arterial.

A veia jugular de ratos tratados com LPS após 6 horas apresentou um relaxamento mais pronunciado a agentes vasodilatadores como a acetilcolina, nitroprussiato de sódio e noradrenalina. Dados da literatura demonstram que após 6 horas do tratamento com LPS aorta de rato apresenta disfunção endotelial com diminuição da resposta a agentes relaxantes (FRIMMEL et al., 2014; TSAO et al., 2012). Achados de Nardi e colaboradores (2014) demonstram que a expressão da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (NOS-1) e da guanilato ciclase está elevada em tecidos vasculares durante a sepse (NARDI et al., 2014). É possível que a expressão destas enzimas esteja aumentada na veia jugular, levando a um aumento da resposta relaxante desse vaso no choque endotoxêmico, no entanto seriam necessárias mais investigações acerca dessa suposição.

A responsividade vascular prejudicada na sepse pode levar à má distribuição do fluxo sanguíneo em órgãos e diminuição da pressão arterial. O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS). Há três genes que codificam três isoformas distintas destas enzimas denominadas de NOS: a óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1), a induzível (NOS-2) e a endotelial (NOS-3) (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001). O NO, que está presente



em quantidades exacerbadas na sepse, é produzido a partir da L-Arginina pela NOS, e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GC). Esta, produz monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A síntese intracelular de GMPc promove uma cascata de eventos intracelulares, dentre eles, ativação de uma série de proteínas quinases dependentes de GMPc, denominadas cGK, que promovem cascatas de sinalizações intracelulares. Um dos principais alvos destas quinases são os canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$  e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcoplasmática, ambos responsáveis pela diminuição dos níveis de cálcio intracelular (LUCAS et al., 2000), além de atuarem diretamente na ativação da fosfatase de cadeia leve de miosina (SURKS, 1999) promovendo o relaxamento celular (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001). Mecanismos dependentes de GMPc contribuem para a perda da contratilidade vascular em choque endotoxêmico, como por exemplo inibição da RhoA/Rho-quinase (SILVA-SANTOS, DA et al., 2009). O LPS induz a expressão da isoforma induzível de NOS (iNOS) nas células do músculo liso vascular. A superprodução de NO a partir de L-arginina resulta em hiperpolarização intracelular e redução da concentração de cálcio, resultando em relaxamento vascular e responsividade reduzida a agentes vasoconstritores (SZABO e WU, 2011).

Em 1978, Cohen e Wiley mostraram que a noradrenalina e a fenilefrina induzem relaxamento de veia jugular de ratos (COHEN e WILEY, 1978). Esse dado é interessante já que o tratamento da insuficiência circulatória em pacientes sépticos na clínica é baseado na administração de agentes vasopressores e inotrópicos, principalmente noradrenalina e dobutamina. No entanto, esses agentes apresentam baixa eficácia em combater o prejuízo cardiovascular observado na sepse (DELLINGER et al., 2013). O mecanismo pelo qual a noradrenalina induz relaxamento em veia jugular é principalmente mediado por ativação de receptores beta-1 adrenérgicos (COHEN e WILEY, 1978). A localização dos receptores beta adrenérgicos, bem como sua participação na reatividade vascular é bastante controversa. Enquanto autores demonstram que a ativação de receptores beta-1 adrenérgicos no músculo liso vascular induz relaxamento de artéria mesentérica de ratos (FLACCO et al., 2013), outros demonstram que a ativação de receptores beta-1 no endotélio de artéria mesentérica de ratos inibe o relaxamento induzido por acetilcolina (YAROVA et al., 2013). Por outro lado, o relaxamento mediado por ativação de receptores beta-2 adrenérgicos tem dependência parcial do endotélio vascular em aorta de ratos (FLACCO et al., 2013), quando parece ser independente do endotélio em artéria pulmonar de ratos (POURAGEAUD et al., 2005).

A acetilcolina e a noradrenalina atuam em receptores acoplados à proteína G para induzir relaxamento vascular (LUCIA, DE et al., 2014; MATLUNG, BAKKER e VANBAVEL, 2009). Por sua vez, o nitroprussiato de sódio, por ser um doador de NO, induz relaxamento de maneira independente da ativação de receptores acoplados à proteína G (BATES et al., 1991). A diferença na resposta observada em 24 horas do nitroprussiato de sódio para acetilcolina e noradrenalina pode se dar pela independência de ativação de receptores metabotrópicos do nitroprussiato de sódio para relaxar a musculatura lisa.

Há relatos na literatura demonstrando a capacidade da fenilefrina em atuar em receptores beta-adrenérgicos causando relaxamento (TORP et al., 2015). Pensando mais uma vez em retorno venoso, o tratamento com noradrenalina utilizado na clínica pode estar aumentando o relaxamento de leitos venosos que possuam receptores beta-adrenérgicos dificultando assim o retorno venoso, e prejudicando a recuperação da pressão arterial na sepse.

## **5.2. Pré-tratamento com 5-HT**

A 5-HT é uma amina biogênica sintetizada em sua maior parte nas células enterocromafins do intestino a partir do aminoácido essencial triptofano (COOPER, BLOOM e ROTH, 2003). No sistema periférico, as plaquetas são responsáveis pelo maior estoque de 5-HT corporal e, apesar de não serem capazes de sintetizar podem captar a partir do plasma a 5-HT produzida (SNEDDON, 1969). Por causa da estreita associação das plaquetas com os vasos sanguíneos, há muitos anos se estuda o papel da 5-HT no controle do tônus vascular e modificação da pressão arterial. Há evidências de que na sepse pode haver agregação plaquetária exacerbada (LEVI, 2008) o que pode levar a uma maior liberação de 5-HT. Por isso utilizamos o pré-tratamento com 5-HT visando observar se este poderia trazer algum efeito aditivo aos do LPS no quadro de sepse experimental.

Em nosso estudo, avaliamos o impacto do pré-tratamento com 5-HT antes do tratamento com LPS em diferentes aspectos cardiovasculares. Na pressão arterial observamos que a 5-HT torna o LPS mais eficaz em causar hipotensão, já que em 9 horas após o tratamento com LPS a queda da pressão arterial foi mais acentuada do que no grupo de animais que recebeu veículo antes do LPS. Além disso, a pressão arterial só foi reestabelecida aos níveis basais em 72 horas após o tratamento com LPS nos animais que foram pré-tratados com 5-HT. Diaz

e colaboradores (2008) descreveram que a pressão arterial de ratos normotensos e hipertensos diminui com infusão de 5-HT (DIAZ et al., 2008). Desta maneira, podemos sugerir que a dose de 5-HT utilizada em nosso estudo (2 mg/Kg) não foi eficaz em diminuir a pressão arterial de ratos normotensos, mas sim em ratos em que um quadro hipotensivo já estava instalado. Se compararmos nossos dados com os de Diaz e colaboradores (2008), estes autores utilizam 25 µg/Kg/minuto de 5-HT o que em 6 horas de tratamento representaria 9 mg/Kg de 5-HT, ou seja, 4,5 vezes maior que a dose que utilizamos em nosso estudo. Ainda, em 24 horas de tratamento a dose administrada representaria 36 mg/Kg, isto é 18 vezes maior do que a dose que utilizamos. Com base nestes dados, podemos sugerir que se aumentássemos a dose de 5-HT utilizada no pré-tratamento, poderíamos observar uma queda na pressão arterial também em ratos tratados com salina. Watts e colaboradores (2012) relatam que o papel da 5-HT em modificar a pressão arterial é complexo e que muitas vezes pode ser contraditório quando comparamos estudos *in vitro* e *in vivo*, e ainda que diferentes patologias podem levar a diferentes respostas da 5-HT em modificar a pressão arterial (WATTS et al., 2012). A 5-HT prejudicou a recuperação da pressão arterial para níveis basais, uma vez que o efeito hipotensor foi observado até 48 horas após o tratamento com LPS. Sugerimos então que na sepse a 5-HT favorece o quadro hipotensivo.

A frequência cardíaca dos animais endotoxêmicos não sofreu alteração pronunciada pelo tratamento com 5-HT em relação aos animais tratados com veículo, ou seja, a diminuição da pressão arterial dos animais tratados com 5-HT antes de LPS foi acompanhada de aumento da frequência cardíaca, que se manteve elevada durante as 72 horas de avaliação, mesmo depois da pressão arterial ter sido recuperada. Sugerimos com esses dados que, assim como nos animais tratados com veículo, o dano miocárdico derivado da administração do LPS tenha sido preservado pela 5-HT, o que contribui para o aumento da frequência cardíaca para manutenção do débito cardíaco mesmo depois da pressão arterial estar normalizada. Em contrapartida, curiosamente, a 5-HT causou um aumento da frequência cardíaca dos animais que foram tratados com salina. Relatos da literatura indicam que a 5-HT interfere com a função cardíaca. O mecanismo pelo qual a 5-HT aumenta a frequência cardíaca (ação cronotrópica positiva) depende da espécie e pode ocorrer através da ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> em rato, 5-HT<sub>4</sub> em porcos e humanos, e 5-HT<sub>7</sub> no gato (CÔTÉ et al., 2003; SAXENA e VILLALÓN, 1991; VILLALÓN et al., 1997).

O tratamento com 5-HT não causou nenhum efeito sobre a dosagem de NO em animais que receberam salina ou LPS em relação aos animais que foram tratados com veículo. Existem evidências de que a 5-HT aumenta a produção de NO a partir de diferentes tipos de células e tecidos, (BORGDORFF, 2002; CHANRION et al., 2007; MANIVET et al., 2000). Além disso, a queda na pressão arterial observada por Diaz e colaboradores (2008) em animais hipertensos e normotensos é dependente de NO, uma vez que a 5-HT não reduz a pressão arterial em animais hipertensos ou normotensos que foram tratados previamente com LNNA (um inibidor da NOS) (DIAZ et al., 2008). No entanto, nossos resultados não apontaram para um aumento na concentração plasmática de NO induzido por 5-HT, o que nos leva a sugerir que o LPS tenha estimulado ao máximo a produção de NO plasmático tornando a 5-HT ineficaz em causar um aumento adicional nesses níveis.

O único efeito que a 5-HT causou no hemograma dos animais endotoxêmicos foi um aumento sutil na contagem de granulócitos dos animais que receberam LPS em 6 horas quando comparado com os animais que receberam pré-tratamento com veículo. As observações nos demais parâmetros avaliados (diminuição de plaquetas, monócitos e linfócitos em 6 e 24 horas após o tratamento com LPS) foram semelhantes às observadas nos animais tratados com veículo.

Diferente do observado nos animais pré-tratados com veículo, o pré-tratamento com 5-HT prejudicou o reestabelecimento da contratilidade da veia jugular dos animais endotoxêmicos em 24 horas.

Em modelos de hipertensão arterial, parece haver *up-regulation* de receptores da 5-HT o que pode contribuir para a hiper-responsividade desses receptores em músculo liso (RUSSELL et al., 2002; WATTS e FINK, 1999). Podemos sugerir, portanto, que em ratos hipotensos deve haver uma *down-regulation* dos receptores da 5-HT envolvidos na sua resposta contrátil o que contribuiria para a hiporreatividade observada em 24 horas após a indução da endotoxemia. Podemos sugerir ainda que a administração prévia de 5-HT favorece ainda mais essa *down-regulation* de seus receptores. Estudos recentes demonstram que a 5-HT pode atuar como um potente agente relaxante em veias mesentéricas superior de ratos e esta resposta parece ser via receptores 5-HT<sub>7</sub> (WATTS et al., 2015). Considerando que o receptor envolvido na contratilidade induzida por 5-HT na veia jugular de ratos é o receptor 5-HT<sub>2A</sub> (LINDER et al., 2010), podemos sugerir que estes estejam diminuídos no sistema venoso na sepse e que receptores associados ao relaxamento vascular como o 5-HT<sub>7</sub> tenham sua expressão aumentada, no entanto mais investigações precisam ser feitas acerca dessa teoria.

Ao analisarmos a resposta relaxante induzida por acetilcolina em veias jugular de animais que receberam 5-HT como pré-tratamento percebemos que o tratamento com serotonina parece ter diminuído a hiper-reatividade induzida por acetilcolina em 6 horas nos animais que receberam LPS. Existem evidências de que a 5-HT inibe a produção de óxido nítrico por inibir sua síntese no músculo liso vascular de ratos (MACHIDA, IIZUKA e HIRAFUJI, 2013; SHIMPO et al., 1997). Em 24 horas, a 5-HT não exerceu nenhum efeito no vasorelaxamento induzido por acetilcolina. Em paralelo a isso, a 5-HT não alterou o relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio e noradrenalina em 6 e 24 horas após o tratamento com LPS, assim como foi observado nos animais que receberam veículo. Essas diferenças podem estar relacionadas aos mecanismos de ação das drogas, pois a acetilcolina depende da enzima para a produção de óxido nítrico, enquanto o nitroprussiato de sódio e noradrenalina independem da produção de NO enzimática para induzir relaxamento vascular. O nitroprussiato de sódio é um doador de NO e atua independentemente de receptores para induzir relaxamento e a noradrenalina provavelmente atua via ativação de receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos, através da ativação da adenilil ciclase com formação de AMP-c para causar relaxamento (FLACCO et al., 2013).

### 5.3. Pré-tratamento com ketanserina

A ketanserina é uma droga considerada antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> e alfa-1 adrenérgicos (WANG et al., 2012). Ela é caracterizada como antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (HOYER, HANNON e MARTIN, 2002) uma vez que tem uma potência duas vezes mais seletiva em antagonizar receptores 5-HT<sub>2A</sub> do que antagonizar receptores 5-HT<sub>2C</sub> (BARNES e SHARP, 1999) e receptores alfa-1 adrenérgicos (KORSTANJE et al., 1986). A ketanserina e sua importância na sepsis já vem sendo estudada acerca de seus efeitos sobre o barreflexo (LIU et al., 2011) e inibição da produção de NO (LIU et al., 2013).

A ketanserina não teve efeito sobre a pressão arterial nas primeiras 6 horas do tratamento com LPS, mas facilitou o restabelecimento dela ao longo do tempo, uma vez que em 12 horas após o tratamento, a pressão já está reestabelecida. Esses dados estão de acordo com estudo de Nishiyama (2009), conduzido de forma semelhante ao nosso, onde o autor utilizou um antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, o sarpogralato, 5 minutos antes de induzir o choque endotoxêmico com

LPS, e demonstrou uma melhora na pressão arterial dos animais tratados com LPS que receberam o tratamento prévio com sarpogralato (NISHIYAMA, 2009). Além de aumentar a pressão arterial, a ketanserina auxilia no reestabelecimento da frequência cardíaca, que voltou aos níveis basais após 24 horas do tratamento, ou seja, a ketanserina previne a permanência da frequência cardíaca em níveis elevados. Sugerimos que a ketanserina possa prevenir o dano da função miocárdica nos animais tratados com LPS. Relatos da literatura já demonstraram que a disfunção do barorreflexo pode agravar o choque séptico e que a ketanserina é uma droga muito eficaz em restaurar a função do barorreflexo (FU et al., 2004; SHEN et al., 2007). Um estudo recente demonstrou que em modelo animal de infarto do miocárdio a ketanserina é capaz de melhorar a função cardíaca após infarto do miocárdio e a angiogênese em miocárdio isquêmico e ainda, restaurar a função do barorreflexo (YU et al., 2013). Outro estudo que vai ao encontro dessa ideia é o de Liu e colaboradores (2011), que demonstra que a ketanserina pode aliviar o choque endotoxêmico restabelecendo a função do barorreflexo, além de diminuir significativamente a mortalidade induzida por uma dose letal de LPS em camundongos (LIU et al., 2011). Nishiyama (2009) relata ainda, que o sarpogralato diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-1 $\beta$  em animais tratados com LPS (NISHIYAMA, 2009). Isso é importante, pois a sepse está associada a uma produção exacerbada de citocinas pró e anti-inflamatórias, que são detectáveis na circulação sanguínea. Citocinas pró-inflamatórias recrutam e ativam leucócitos, com o objetivo de controlar a infecção na sepse, entretanto sua produção em excesso é deletéria e níveis elevados são marcadores de mal prognóstico na sepse (CAVAILLON et al., 2003). Estudos demonstram que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, mediadas pelo aumento da produção de NO, levam ao crescimento na taxa de mortalidade tanto em pacientes sépticos como em modelos experimentais, devido à inibição no recrutamento de neutrófilos (TAVARES-MURTA, CUNHA e FERREIRA, 1998).

A ketanserina parece influenciar não só a frequência cardíaca e pressão arterial, mas também, a dosagem plasmática de NO tanto em 6 quanto em 24 horas após o tratamento com LPS, diminuindo suas concentrações plasmáticas nos dois tempos avaliados. Esses dados estão de acordo com relatos da literatura que revelaram que a ketanserina é capaz de diminuir o aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) ocasionada por LPS no coração, pulmões, fígado e rins de camundongos, além de diminuir os níveis de nitrito/nitrato (os principais metabólitos do NO) no plasma de camundongos tratados com

LPS. Ambos os efeitos da ketanserina, nesse estudo, são dependentes da dose utilizada. Além disso, uma diminuição nas dosagens de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  é ocasionada por ketanserina (LIU et al., 2013). NO promove a liberação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6 (BULTINCK et al., 2006; ZINGARELLI et al., 1997) e sua produção excessiva está relacionada com a ativação de cascatas inflamatórias através da ativação de NF-kB (AZNAVOUR et al., 2012; CUZZOCREA et al., 2006; GILAD et al., 1998). Embora não tenhamos dosado citocinas inflamatórias, pelos relatos que encontramos na literatura é possível sugerir que a ketanserina pode apresentar efeitos anti-inflamatórios, provenientes da diminuição do NO.

A ketanserina preveniu a diminuição acentuada das plaquetas após 24 horas do tratamento com LPS. Uma explicação para isso é que há receptores 5-HT<sub>2A</sub> em plaquetas e uma vez estimulados promovem agregação plaquetária, resultando na liberação de mais de 5-HT (ZELLERS et al., 1991). A inibição da agregação plaquetária seria apenas mais um dos efeitos protetores no choque endotoxêmico que a ketanserina parece exercer. Outro dado que reforça essa explicação é que o sarpogrelato, um antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, diminui a agregação plaquetária em artéria carótida com endotélio lesionado (HOUKIN et al., 2006). O sarpogrelato também é capaz de inibir a agregação plaquetária dependente da dose *in vitro* e ainda diminui os níveis de serotonina no sobrenadante das preparações (NAKAMURA et al., 1999).

Por fim, a ketanserina melhorou a resposta contrátil e relaxante das veias jugulares de animais que foram tratados com LPS. A hiporreatividade na contratilidade induzida por 5-HT em veia jugular de animais que foram tratados com LPS desapareceu nos animais que foram pré-tratados com ketanserina. O tratamento prévio com ketanserina também aumentou a contratilidade dos animais tratados com salina. A ketanserina parece potencializar a contração do músculo liso da veia jugular frente a agentes contráteis. Sugerimos a ketanserina possa prevenir a possível *down-regulation* dos receptores da 5-HT na veia jugular ocasionada durante a sepse como discutido acima favorecendo a contração venosa. Além disso, a ketanserina previniu o efeito hiper-responsivo que observamos a agentes relaxantes em animais que receberam LPS. Esses dados associados à diminuição de NOx plasmático podem justificar os efeitos benéficos da ketanserina na pressão arterial, após 12 horas do tratamento com LPS.

Tanto a dopamina quanto a noradrenalina são fármacos de primeira escolha para tratar pacientes com choque séptico na tentativa de restaurar a pressão arterial e a perfusão orgânica (BEALE et al., 2004).

Estudos recentes demonstram que a utilização de antagonistas  $\beta$ -1 adrenérgicos associados ao tratamento de escolha podem ser benéficos para pacientes com sepse grave ou choque séptico por reduzirem o débito cardíaco e a frequência cardíaca sem efeitos adversos sobre a função cardíaca e perfusão sistêmica (CHEN et al., 2013; MORELLI et al., 2013). Estes autores ainda relatam que os antagonistas beta-1 adrenérgicos previnem a lesão no miocárdio e diminuem os índices de mortalidade no choque séptico. Em nosso estudo demonstramos o efeito da noradrenalina em relaxar de maneira exacerbada a veia jugular em animais que foram tratados com LPS. Podemos sugerir, portanto, que na sepse alguns leitos vasculares estão hiper-reativos à ativação de receptores beta-1 adrenérgicos, o que seria uma razão adicional para o benefício do tratamento com antagonistas beta-1 adrenérgicos.

Vimos em nosso estudo que a ketanserina melhora a frequência cardíaca, a pressão arterial e ainda abole a hiper-reatividade do vaso em relaxar com a noradrenalina e a hiporreatividade em contrair com 5-HT. Sugerimos que esse antagonista possa fazer parte do tratamento futuro na clínica da sepse.

No entanto para melhor elucidar esses resultados e mecanismos pelos quais isso acontece, seriam necessários mais estudos utilizando diferentes doses de pré-tratamento da ketanserina; avaliação de outros antagonistas de receptores da 5-HT; além de estudos em outro modelo experimental de sepse. Além disso, fazer o tratamento com ketanserina após o choque endotoxêmico instalado seria de suma importância para avaliar esta droga como um tratamento efetivo não na prevenção, mas sim na cura de um quadro séptico.



## 6. CONCLUSÃO

- ✓ A reatividade venosa está prejudicada no choque endotoxêmico, podendo ser mais um fator contribuindo para a diminuição da pressão arterial nesta patologia;
- ✓ A administração de 5-HT previamente ao tratamento com LPS dificulta o reestabelecimento da pressão arterial, frequência cardíaca e reatividade venosa;
- ✓ A ketanserina, antagonista do receptor da 5-HT<sub>2A</sub>, ameniza os efeitos sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, reatividade venosa e produção de NO causados pelo LPS;
- ✓ A 5-HT, que sugerimos ser proveniente da agregação plaquetária, está envolvida em na hiporreatividade venosa e hipotensão arterial observadas na sepse.



## 7. REFERÊNCIAS

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive care medicine**, v. 28, n. 2, p. 108–21.

ALDEN, K. J. et al. Effect of aminoguanidine on plasma nitric oxide by-products and blood flow during chronic peritoneal sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 9, n. 4, p. 289–95, 1998.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E. e KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.

AMSTERDAM, J. D. et al. Blood pressure changes during short-term fluoxetine treatment. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 9–14, 1999.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.

AYALA, A. et al. Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis. **Novartis Foundation Symposium**, v. 280, p. 37–49; discussion 49–52, 160–4, 2007.

AZNAVOUR, N. et al. MPTP animal model of Parkinsonism: dopamine cell death or only tyrosine hydroxylase impairment? A study using PET imaging, autoradiography, and immunohistochemistry in the cat. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 18, n. 11, p. 934–41, 2012.

BARNABY, D. et al. Heart rate variability in emergency department patients with sepsis. **Academic Emergency Medicine : Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine**, v. 9, n. 7, p. 661–70, 2002.

BARNES, N. M. e SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083–152, 1999.

BATES, J. N. et al. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. S157–S165, 1991.

BEALE, R. J. et al. Vasopressor and inotropic support in septic shock: an evidence-based review. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 11 Suppl, p. S455–65, 2004.

BEN-SHAUL, V. et al. Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 12, n. 4, p. 288–93, 1999.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–55, 1992.

BORGDORFF, P. Hypotension Caused by Extracorporeal Circulation: Serotonin From Pump-Activated Platelets Triggers Nitric Oxide Release. **Circulation**, v. 106, n. 20, p. 2588–2593, 2002.

BRACKETT, D. J. et al. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circulatory Shock**, v. 17, n. 4, p. 273–84, 1985.

BRENNER, B. et al. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 206–15, 2007.

BRYAN, N. S. e GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645–57, 2007.

BULTINCK, J. et al. Systemic NO production during (septic) shock depends on parenchymal and not on hematopoietic cells: in vivo iNOS expression pattern in (septic) shock. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 13, p. 2363–5, 2006.

BURAS, J. a; HOLZMANN, B. e SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–65, 2005.

CASTELLHEIM, a et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 6, p. 479–91, 2009.

CAVAILLON, J.-M. et al. Cytokine cascade in sepsis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 35, n. 9, p. 535–44, 2003.

CELES, M. R. N.; PRADO, C. M. e ROSSI, M. a. Sepsis: going to the heart of the matter. **Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology**, v. 80, n. 2, p. 70–86, 2013.

CHANRION, B. et al. Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 19, p. 8119–24, 2007.

CHEN, J. et al. Effects of adrenergic beta-1 antagonists on hemodynamics of severe septic patients. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 93, n. 16, p. 1243–6, 2013.

CINEL, I. e OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 1, p. 291–304, 2009.

COHEN, M. L. e WILEY, K. S. Rat jugular vein relaxes to norepinephrine, phenylephrine and histamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 205, n. 2, p. 400–9, 1978.

COKER, S. J. et al. The release of prostanoids during the acute pulmonary response to E. coli endotoxin in anaesthetized cats. **British Journal of Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 561–570, 1983.

CONSENSUS, A. C. of C. P. of C. C. M. e CONFERENCE:, C. C. A. C. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**. v. 20, p. 864-874, 1992.

COOPER, J; BLOOM, F. e ROTH R. **The biochemical Basis of Neuropharmacology**. v.51, p.400, 2003.

COSTA, C. M. DE. “The contagiousness of childbed fever”: a short history of puerperal sepsis and its treatment. **The Medical Journal of Australia**, v. 177, n. 11-12, p. 668–71, 2002.

CÔTÉ, F. et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13525–30, 2003.

CUZZOCREA, S. et al. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 1, p. 73–81, 2006.

DAVIS, R. P. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) reduces total peripheral resistance during chronic infusion: direct arterial mesenteric relaxation is not involved. **BMC Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 4, 2012.

DAVIS, R. P. et al. One-month serotonin infusion results in a prolonged fall in blood pressure in the deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertensive rat. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 141–8, 2013.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 2, p. 165–228, 2013.

DIAZ, J. et al. 5-Hydroxytryptamine Lowers Blood Pressure in Normotensive and Hypertensive Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 3, p. 1031–8, 2008.

ENDO, Y. Induction of hypoglycaemia and accumulation of 5-hydroxytryptamine in the liver after the injection of mitogenic substances into mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 645–650, 1984.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E. e HOFFMAN, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 22, p. 10993–7, 1992.

ERSPAMER, V. e ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, n. 4306, p. 800–1, 1952.

FETKOVSKA, N. et al. 5-Hydroxytryptamine kinetics and activation of blood platelets in patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 15, n. 3, p. 267–273, 1990.

FINK, G. D. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. Sympathetic activity, vascular capacitance, and long-term regulation of arterial pressure. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 307–12, 2009.

FLACCO, N. et al. Different  $\beta$ -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 2, p. 413–25, 2013.

FLYNN, A.; CHOKKALINGAM MANI, B. e MATHER, P. J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. **Heart Failure Reviews**, v. 15, n. 6, p. 605–11, 2010.

FRIMMEL, K. et al. The effect of omega-3 fatty acids on expression of connexin-40 in Wistar rat aorta after lipopolysaccharide administration. **Journal of Physiology and Pharmacology : an Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 65, n. 1, p. 83–94, 2014.

FU, Y.-J. et al. Restoration of baroreflex function by ketanserin is not blood pressure dependent in conscious freely moving rats. **Journal of Hypertension**, v. 22, n. 6, p. 1165–72, 2004.

GELMAN, S. Venous function and central venous pressure: a physiologic story. **Anesthesiology**, v. 108, n. 4, p. 735–48, 2008.

GEROULANOS, S. e DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077, 2006.

GILAD, E. et al. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of

NFkappaB activation. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 9, p. 685–93, 1998.

GONÇALVES, R. P. M. et al. Gender-specific differences in the in situ cardiac function of endotoxemic rats detected by pressure-volume catheter. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 42, n. 5, p. 415–23, 2014.

GRANUCCI, F.; FOTI, M. e RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell biology. **Advances in Immunology**, v. 88, n. 05, p. 193–233, 2005.

GUARIDO, K. L. et al. Increased activation of the Rho-A/Rho-kinase pathway in the renal vascular system is responsible for the enhanced reactivity to exogenous vasopressin in endotoxemic rats. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 6, p. e461–71, 2014.

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1813–6, 1991.

HINSHAW, L. B. et al. Lethal Staphylococcus aureus-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. **The Journal of Trauma**, v. 33, n. 4, p. 568–73, 1992.

HOTCHKISS, R. S. e NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 11, p. 813–22, 2006.

HOUKIN, K. et al. The 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor antagonist sarpogrelate hydrochloride inhibits acute platelet aggregation in injured endothelium. **The Journal of International Medical Research**, v. 34, n. 1, p. 65–72, 2006.

HOYER, D. et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 157–203, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J. P. e MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 4, p. 533–554, 2002.



JACOBS, B. L. e AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–229, 1992.

KILBOURN, R. The discovery of nitric oxide as a key mediator in septic shock. **Sepsis**, v. 1, n. 2, p. 85–91, 1998.

KILBOURN, R. G. et al. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 9, p. 3629–32, 1990.

KORSTANJE, C. et al. Characterization of flufylline, fluprofylline, ritanserin, butanserin and R 56413 with respect to in-vivo alpha 1-, alpha 2- and 5-HT<sub>2</sub>-receptor antagonism and in-vitro affinity for alpha 1-, alpha 2- and 5-HT<sub>2</sub>-receptors: comparison with ketanserin. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 374–9, 1986.

KUROKI, M. T.; FINK, G. D. e OSBORN, J. W. Comparison of arterial pressure and plasma ANG II responses to three methods of subcutaneous ANG II administration. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 5, p. H670–9, 2014.

LAZARTIGUES, E. et al. Fluoxetine-induced pressor response in freely moving rats: a role for vasopressin and sympathetic tone. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 443–51, 2000.

LEE, R. P. et al. Physiological and Chemical Indicators for Early and Late Stages of Sepsis in Conscious Rats. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 6, p. 613–621, 2002.

LEVI, M. The coagulant response in sepsis. **Clinics in chest medicine**, v. 29, n. 4, p. 627–42, 2008.

LINDER, A. E. et al. Serotonin ( 5-HT ) in veins : not all in vain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 415–21, 2007.

LINDER, A. E.; NI, W.; et al. A Serotonergic System in Veins : Serotonin Transporter-Independent Uptake. **The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 3, p. 714–22, 2008.

LINDER, A. E.; DIAZ, J.; et al. Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 4, p. H1745–52, 2008.

LINDER, A. E. et al. Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 116–23, 2010.

LIU, C. et al. Effects of ketanserin on endotoxic shock and baroreflex function in rodents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 10, p. 1605–12, 2011.

LIU, C. et al. The protective action of ketanserin against lipopolysaccharide-induced shock in mice is mediated by inhibiting inducible NO synthase expression via the MEK/ERK pathway. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 658–66, 2013.

LÓPEZ, A. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 1, p. 21–30, 2004.

LUCAS, K. A. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–414, 2000.

LUCIA, C. DE et al. Adrenal adrenoceptors in heart failure. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 246, 2014.

MACARTHUR, H. et al. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9753–9758, 2000.

HIRAFUJI, M. Recent advances in 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor research: how many pathophysiological roles does 5-HT play via its multiple receptor subtypes? Foreword. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1391, 2013.

MANIVET, P. et al. PDZ-dependent Activation of Nitric-oxide Synthases by the Serotonin 2B Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9324–31, 2000.

MARSHALL, J. C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 29, n.7, p. S99–106, 2001.

MARTIN, J. B. e WHEELER, A. P. Approach to the patient with sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 1, p. 1–16, 2009.

MATLUNG, H. L.; BAKKER, E. N. T. P. e VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 7, p. 1699–709, 2009.

MITAKA, C. et al. Beneficial effect of carboxy-PTIO on hemodynamic and blood gas changes in septic shock dogs. **Critical care (London, England)**, v. 1, n. 1, p. 45–50, 1997.

MORELLI, A. et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 310, n. 16, p. 1683–91, 2013.

NAKAMURA, K. et al. Effects of sarpogrelate hydrochloride on platelet aggregation, and its relation to the release of serotonin and P-selectin. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Thrombosis**, v. 10, n. 8, p. 513–9, 1999.

NARDI, G. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 6, p. 391–400, 2014.

NDUKA, O. O. e PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 41–66, 2011.

NI, W. et al. The serotonin transporter is present and functional in peripheral arterial smooth muscle. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 770–81, 2004.

NI, W. et al. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 663–74, 2008.

NI, W. e WATTS, S. W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 33, n. 7, p. 575–83, 2006.

NISHIYAMA, T. Acute effects of sarpogrelate, a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist on cytokine production in endotoxin shock model of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 614, n. 1-3, p. 122–7, 2009.

PARKER, M. M. et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Annals of internal medicine**, v. 100, n. 4, p. 483–90, 1984.

POURAGEAUD, F. et al. Role of beta<sub>2</sub>-adrenoceptors (beta-AR), but not beta<sub>1</sub>-, beta<sub>3</sub>-AR and endothelial nitric oxide, in beta-AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 372, n. 1, p. 14–23, 2005.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 672–81, 2005.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A. e PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 3, p. 1243–51, 1948.

REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 13, n. 2, p. 110–6, 2000.

ROTHER, C. F. Physiology of venous return. An unappreciated boost to the heart. **Archives of Internal Medicine**, v. 146, n. 5, p. 977–82, 1986.

ROVAL, L. E.; HERSCHMAN, H. R. e SMITH, J. B. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX , KC , and MIP-2 have distinct induction kinetics , tissue distributions , and tissue-specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 494–502, 1998.

RUSSELL, A. et al. 5-Hydroxytryptamine 2B receptor function is enhanced in the N ω-nitro-l-arginine hypertensive rat. **Journal of**

**Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 1, p. 179-187, 2002.

RUSSELL, J. a. Management of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699–713, 2006.

SAXENA, P. R. e VILLALÓN, C. M. 5-Hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 223–7, 1991.

SCHMITT, M. e BLACKMAN, D. Assessment of venous capacitance. Radionuclide plethysmography: methodology and research applications. **British journal of clinical pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 565, 2002.

SHEN, F.-M. et al. Ketanserin-induced baroreflex enhancement in spontaneously hypertensive rats depends on central 5-HT(2A) receptors. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, n. 8, p. 702–7, 2007.

SHIMPO, M. et al. Serotonin inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells stimulated with interleukin-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 338, n. 1, p. 97–104, 1997.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. 251–60, 2004.

SILVA-SANTOS, J. E. DA et al. The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1716–23, 2009.

SILVA-SANTOS, J. E. DA; TERLUK, M. R. e ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 17, n. 1, p. 70–6, 2002.

SNEDDON, J. M. Sodium-dependent accumulation of 5-hydroxytryptamine by rat blood platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 680–688, 1969.

SORRENTINO, R. et al. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in a model of a delayed vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 6, p. 1447–53, 1999.

STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The pathogenesis of sepsis. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 19–48, 2011.

SURKS, H. K. Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP- Dependent Protein Kinase I. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1583–1587, 1999.

SZABO, C. e WU, C. Role of nitric oxide in the development of vascular contractile dysfunction in circulatory shock. **J Med Sci**, v. 31, n. 1, p. 001-016 2011.

TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q. e FERREIRA, S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **British journal of pharmacology**, v. 124, n. 7, p. 1369–74, 1998.

TORP, K. D. et al.  $\beta$  - Receptor agonist activity of phenylephrine in the human forearm. **Journal of Applied Physiology (Bethesda)**, v. 90, n. 5, p. 1855–9, 2015.

TSAO, C.-M. et al. Effect of propofol on vascular reactivity in thoracic aortas from rats with endotoxemia. **Journal of the Chinese Medical Association : JCMA**, v. 75, n. 6, p. 262–8, 2012.

UEMATSU, S. e AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 84, n. 9, p. 712–25, 2006.

ULLMER, C. et al. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. **FEBS letters**, v. 370, n. 3, p. 215–21, 1995.

VANHOUTTE, P. M. Platelet-derived serotonin, the endothelium, and cardiovascular disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17 Supl 5, p. S6–12, 1991.

VAYSSETTES-COURCHAY, C. et al. Cutaneous venous dysfunction studied in vivo in the LPS-treated rabbit: implication of NO in saphenous vein hyporeactivity. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 367, n. 5, p. 516–23, 2003.

VILLALÓN, C. M. et al. Characterization of putative 5-HT<sub>7</sub> receptors mediating tachycardia in the cat. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 6, p. 1187–95, 1997.

VINCENT, J.-L. e ABRAHAM, E. The last 100 years of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 3, p. 256–63, 2006.

VINCENT, J.-L.; YAGUSHI, A. e PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. S313–7, 2002.

WALTHER, D. J. et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5603, p. 76, 2003.

WANG, D. et al. Inhibition of SNL-induced upregulation of CGRP and NPY in the spinal cord and dorsal root ganglia by the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist ketanserin in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 379–86, 2012.

WATTS, S. W. et al. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 359–88, 2012.

WATTS, S. W. et al. 5-HT is a potent relaxant in rat superior mesenteric veins. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 3, n. 1, p. e00103, 2015.

WATTS, S. W. e FINK, G. D. 5-HT<sub>2B</sub>-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 3 Pt 2, p. 944–52, 1999.

WIEDEMAN, M. P. Dimensions of blood vessels from distributing artery to collecting vein. **Circulation Research**, v. 12, p. 375–8, 1963.

YAROVA, P. L. et al.  $\beta_1$ -Adrenoceptor stimulation suppresses endothelial IK(Ca)-channel hyperpolarization and associated dilatation in

resistance arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 4, p. 875–86, 2013.

YU, J. et al. Ketanserin improves cardiac performance after myocardial infarction in spontaneously hypertensive rats partially through restoration of baroreflex function. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 12, p. 1508–14, 2013.

ZELLERS, T. M. et al. Heterogeneity of endothelium-dependent and endothelium-independent responses to aggregating platelets in porcine pulmonary arteries. **Circulation Research**, v. 68, n. 5, p. 1437–45, 1991.

ZHANG, S. et al. Interception of the endotoxin-induced arterial hyporeactivity to vasoconstrictors. **Vascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 15–23, 2014.

ZINGARELLI, B. et al. The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 2, p. 259–67, 1997.

ZIVOT, J. B. e HOFFMAN, W. D. Pathogenic effects of endotoxin. **New Horizons (Baltimore, Md.)**, v. 3, n. 2, p. 267–75, 1995.